Über die Reaktion einiger enzymatisch gebildeter o-Chinone mit Thiolverbindungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jorg Dieter Freiherr von Lehmann
aus Berlin

1966

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Über die Reaktion einiger enzymatisch gebildeter o-Chinone mit Thiolverbindungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jorg Dieter Freiherr von Lehmann
aus Berlin

1966

1. Referent: Professor Dr. K. -H. Frömming

2. Referent: Professor Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1966

Tag der Promotion:

- 9. NOV. 1966

Diese Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität in Berlin-Dahlem durchgeführt.

Die Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Professor Dr. K.-H. FRÖMMING, dem ich für die Überlassung des Themas, die Förderung meiner wissenschaftlichen Weiterbildung und die Diskussion der Probleme, die bei der Durchführung der Untersuchungen auftraten, danke.

Herrn Professor Dr. G. SCHENCK bin ich für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0088

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung und Problemstellung 4

B. Allgemeiner Teil 9

I. Untersuchungen über den Reaktionsablauf in dem System Phenoloxydase/Brenzkatechinderivat/Thiolverbindung 9

II. Addition von Thiolverbindungen an enzymatisch oxydierte Brenzkatechinderivate 20

a. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin/Thiophenol 20

b. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin/Thiosalicylsäure 25

c. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5-Dimethylbrenzkatechin/Thiophenol 27

d. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5-Dimethylbrenzkatechin/Thioglykolsäure 31

e. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5-Dimethylbrenzkatechin/Thiosalicylsäure 33

f. Einwirkung der Phenoloxydase auf 3-Methoxybrenzkatechin/Thiophenol 37

g. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin/Cystein bzw. 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin/Glutathion 39

III. Addition von Thiolverbindungen an o-Chinone, die durch enzymatische Oxydation von Monophenolen entstanden sind 41

C. Experimenteller Teil

I. Beschreibung der Versuche 42

a. Darstellung der Kartoffel-Phenoloxydase 42

b. Champignon-Phenoloxydase 42

c. Manometrische Messungen 43

d. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen 43

Seite

e. Spektralphotometrische Messungen 44
f. Elementaranalysen 44
g. IR-Spektralphotometrie 44
h. Purpurogallinbestimmung 44
i. Reaktionsansätze zum dünnschichtchromatographischen und spektralphotometrischen Nachweis der Additionsprodukte 45

II. Darstellungen und Isolierungen

a. 4,5,6-Trimethyl-o-benzochinon 49
b. 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin 49
c. 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (I) 49
d. o-(5,6-Dihydroxy-2,3,4-trimethyl-phenylthio)-benzoesäure (II) 50
e. Isolierung des enzymatisch dargestellten 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechins (I) 51
f. Isolierung der enzymatisch dargestellten o-(5,6-Dihydroxy-2,3,4-trimethyl.phenylthio)-benzoesäure (II) 52
g. 4,5-Dimethyl-o-benzochinon 53
h. 4,5-Dimethylbrenzkatechin 53
i. 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III) 53
k. Isolierung des enzymatisch dargestellten 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechins (III) 54
l. 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-o-benzochinon 54
m. 4,5-Dimethyl-3,6-di-(phenylthio)-brenzkatechin (IV) 54
n. Lakton (V) aus 4,5-Dimethyl-o-benzochinon und Thioglykolsäure 55
o. o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI) 55

Seite

p. Isolierung der enzymatisch dargestellten o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI) 56

q. 4,5-Dimethyl-3-(o-carboxy-phenylthio)-o-benzochinon (VIII) 56

r. 4,5-Dimethyl-3,6-di-(o-carboxy-phenylthio)-brenzkatechin (VII) 57

s. 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechin (IX) 57

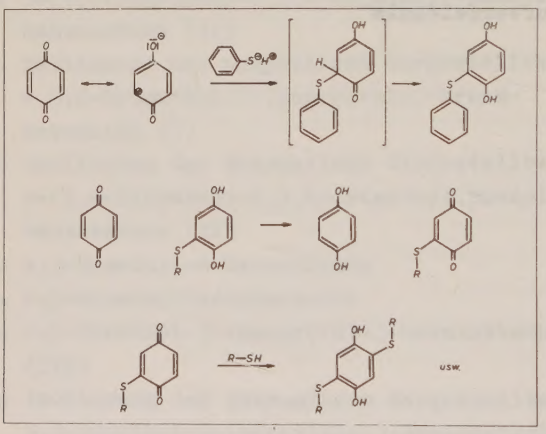
t. Isolierung des enzymatisch dargestellten 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechins (IX) 57

D. Zusammenfassung 59

E. Literaturverzeichnis 61

A. Einleitung und Problemstellung

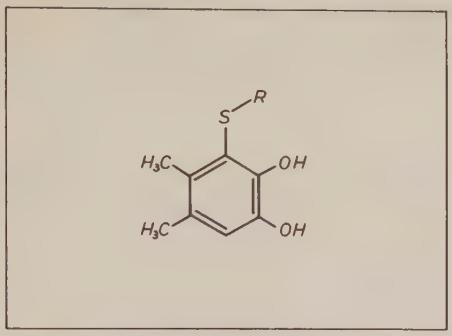
1896 berichteten J. TROEGER und A. EGGERT (1) erstmals über die Addition von einem Merkaptan, dem Thiophenol, an das p-Chinon. Analytische Untersuchungen wiesen auf eine additionelle Verbindung aus 1 Mol p-Chinon + 2 Mol Thiophenol. T. POSNER (2) stellte bald darauf fest, daß die normalen Reaktionsprodukte bei diesen Reaktionen in 2,5-Stellung disubstituierte Thioäther des Hydrochinons waren. O. DIMROTH und Mitarbeiter (3), sowie M. SCHUBERT (4) konnten später auch tri- und tetrasubstituierte Hydrochinone bei solchen Reaktionen feststellen. Die Reaktion läuft wie folgt ab:



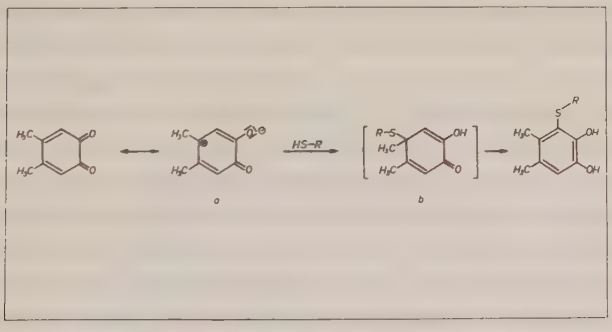
Dehydrierung zum Disulfid wird im allgemeinen nur beim Zusammenschmelzen der Komponenten bei höherer Temperatur beobachtet. In Lösung findet durchweg Addition statt.

Weniger ist bisher über derartige Additionen an o-Chinone bekannt. Erstmals gelang es L. HORNER und K. STURM (5) 1955 Monoadditionsprodukte durch Reaktion von 4,5-Dimethyl-o-

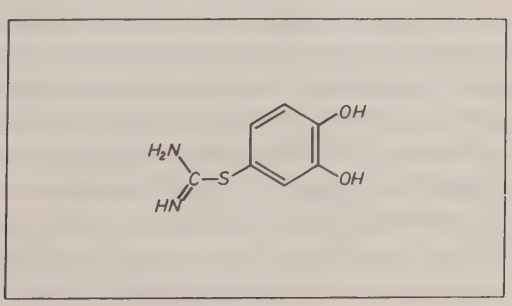
chinon mit Thiophenol und Thiosalicylsäure zu erhalten, die die folgende Struktur hatten:



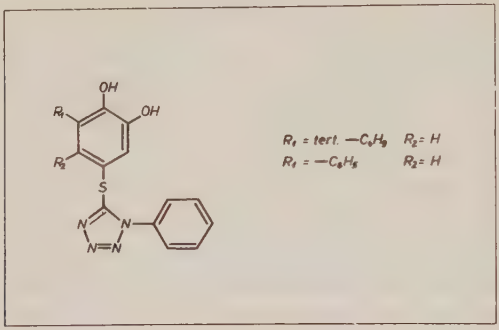
Sie führten die Reaktion ebenfalls auf eine 1,4-Addition zurück, die über die Grenzstruktur a und die unbeständige Zwischenstufe b erfolgen soll:



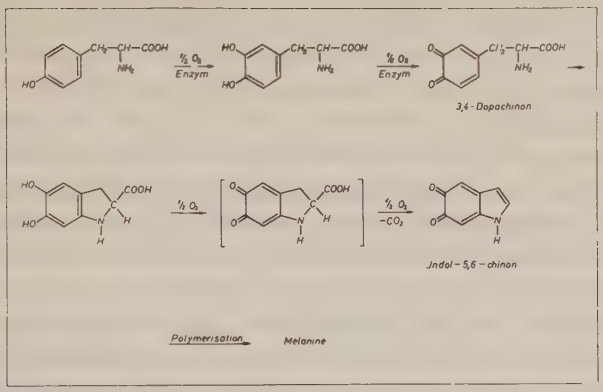
H.W. WANZLICK (6) berichtete über die Addition von Thioharnstoff an o-Chinon zu 3,4-Dihydroxyphenylisothioharnstoff.



R.F. PORTER und Mitarbeiter (7) setzten einige o-Chinonderivate mit 1-Phenyl-5-merkaptotetrazol zu monosubstituierten Thioäthern um.



Thiolverbindungen, insbesondere Cystein und Glutathion spielen auch im physiologischen Geschehen eine wesentliche Rolle. Cystein ist bekanntlich Baustein einer großen Anzahl von Eiweißstoffen. Durch die Möglichkeit der Oxydation zum Cystin, die auch im Peptidverband besteht, ist z.B. die Fähigkeit zu einer Kettenverknüpfung gegeben. Daneben spielen freie SH-Gruppen eine große Rolle für die Wirksamkeit einer Anzahl von Enzymen.
Bekannt ist seit längerer Zeit, daß Thiolverbindungen eine Hemmwirkung auf die Melaninbildung ausüben, wobei bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte, ob es sich hierbei um eine Inhibition der Phenoloxydase handelt. Dieses Enzym ist für die Melaninbildung verantwortlich und enthält als Wirkgruppe Kupfer. So wäre eine Hemmung des Enzyms über eine Komplexbildung mit dem Kupfer zu erklären. Die andere Möglichkeit der Hemmung besteht darin, daß die Thiolverbindungen mit chinoiden Zwischenprodukten auf dem Wege zum Melanin Additionsverbindungen bilden und so den weiteren Reaktionsweg unterbinden. Aus dem nachfolgenden, nicht vollständigen Reaktionsschema sind einige der zu einer Addition befähigten chinoiden Stufen zu ersehen:



Untersuchungen über eine Reaktion zwischen 3,4-Dopachinon und Thiolverbindungen wurden von S. BOUCHILLOUX und A. KODJA (8) angestellt.

Der Einbau von Thiolverbindungen in das Melanin wird von L. HORNER (5) und R.E. BILLINGHAM (9) diskutiert, da es nach diesen Autoren unwahrscheinlich ist, daß das native Melanin lediglich durch Polyaddition des Indol-5,6-o-benzochinons zustande kommt.

S. ROSTON (10) fand, daß Glutathion mit dem chinoiden Oxydationsprodukt des Adrenalins reagiert und hierdurch die Bildung von Adrenochrom unterbinden konnte. Er konnte nachweisen, daß im menschlichen Blut der Gehalt an nicht-eiweißartigen Thiolverbindungen nach Zugabe von Adrenalin sinkt.

Der gleiche Autor stellte bei der Einwirkung der Phenol-oxydase auf das System Adrenalin/Coenzym A eine Reaktion zwischen dem enzymatisch entstandenen Adrenochrom und der S-H-Gruppe des Coenzyms A fest (11). Nach diesem Autor besteht die Möglichkeit, das eine der physiologischen Funktionen der Catecholamine in derartigen Inaktivierungs-prozessen liegt.

E.A.H. ROBERTS (12) vermutet, daß die Kombination zwischen Flavonol-o-chinon und schwefelhaltigen Aminosäuren eine

Rolle in der Teefermentation spielt. H.S. MASON (13) behauptet, daß phenolische Thioäther, die durch die Einwirkung der Phenoloxydase auf Brenzkatechinderivate und Glutathion entstehen, kein Substrat für das Ferment darstellen. Eine Oxydation durch überschüssiges o-Chinon ist jedoch möglich.

Bei den enzymatischen Versuchen, ist es bisher jedoch nicht gelungen, die Reaktionsprodukte, die bei der Umsetzung in Gegenwart von Thiolverbindungen entstehen, zu isolieren und mit Sicherheit zu charakterisieren. Auch ihre weitere enzymatische Oxydierbarkeit konnte daher nicht exakt untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb einfach gebaute Thiolverbindungen, wie Thiophenol, Thiosalicylsäure und Thioglykolsäure mit einfachen Brenzkatechinderivaten in enzymatischer Reaktion umgesetzt werden. Als Enzym wurde die Phenoloxydase herangezogen, die einmal monophenolische Verbindungen zu entsprechenden o-Dihydroxybenzolen und zum anderen o-Dihydroxyverbindungen zu den entsprechenden o-Chinonen oxydieren kann.

B. Allgemeiner Teil

I. Untersuchungen über den Reaktionsablauf in dem System Phenoloxydase/Brenzkatechinderivat/Thiolverbindung

Bevor die Reaktion zwischen enzymatisch dargestellten o-Chinonen und Thiolen näher untersucht wurde, galt es festzustellen, ob eine fermenthemmende Wirkung der Thiole bei den in dieser Arbeit auftretenden Reaktionsbedingungen zu erwarten ist. Die Angaben in der Literatur hierüber sind unterschiedlich. Während D. KERTESZ (14) von einer vollständigen Fermentinhibierung berichtet, zeigen Arbeiten von S. BOUCHILLOUX (8), S. ROSTON (11), E.A.H. ROBERTS (12) und H.S. MASON (13) eine gesicherte oxydative Einwirkung des Enzyms auf Brenzkatechinderivate in Gegenwart von Thiolverbindungen. Es scheint, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation in dem System Phenoloxydase/Brenzkatechin/Thiolverbindung entscheidend von den Konzentrationen dieser drei Komponenten abhängt.

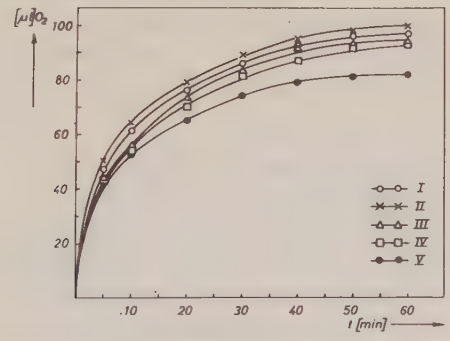


Abb. 1: Einwirkung der Phenoloxydase auf Brenzkatechin unter Zusatz steigender Mengen Cysteinhydrochlorid
I : 0,44 mg Brenzkatechin
II : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,063 mg Cystein-HCl
III : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,315 mg Cystein-HCl
IV : 0,44 mg Brenzkatechin + 3,15 mg Cystein-HCl
V : 0,44 mg Brenzkatechin + 6,30 mg Cystein-HCl
Reaktionsansatz: 1,75 ml Puffer pH 7,0; 0,25 ml Methanol; 0,5 ml Fermentverdünnung 1:10; 25°

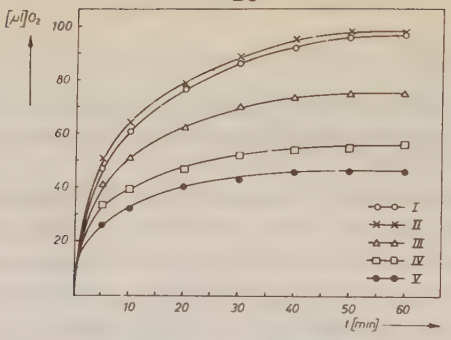


Abb. 2: Einwirkung der Phenoloxydase auf Brenzkatechin unter Zusatz steigender Mengen Thiophenol

I : 0,44 mg Brenzkatechin

II : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,044 mg Thiophenol

III : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,22 mg Thiophenol

IV : 0,44 mg Brenzkatechin + 2,20 mg Thiophenol

V : 0,44 mg Brenzkatechin + 4,40 mg Thiophenol

Reaktionsansatz: 1,75 ml Puffer pH 7,0; 0,25 ml Methanol; 0,5 ml Fermentverdünnung 1:10; 25°

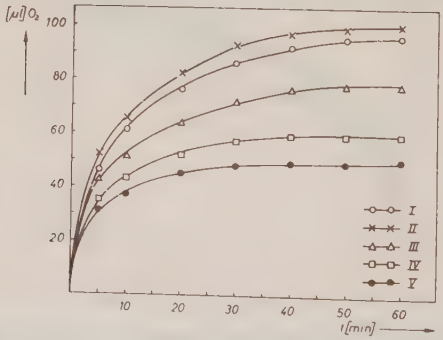


Abb. 3: Einwirkung der Phenoloxydase auf Brenzkatechin unter Zusatz steigender Mengen Thiosalicylsäure

I : 0,44 mg Brenzkatechin

II : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,062 mg Thiosalicylsäure

III : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,31 mg Thiosalicylsäure

IV : 0,44 mg Brenzkatechin + 3,10 mg Thiosalicylsäure

V : 0,44 mg Brenzkatechin + 6,20 mg Thiosalicylsäure

Reaktionsansatz: 1,75 ml Puffer pH 7,0; 0,25 ml Methanol; 0,5 ml Fermentverdünnung 1:10; 25°

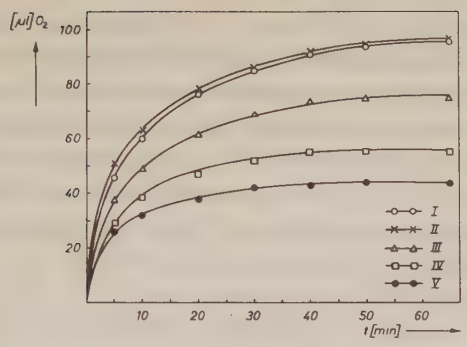
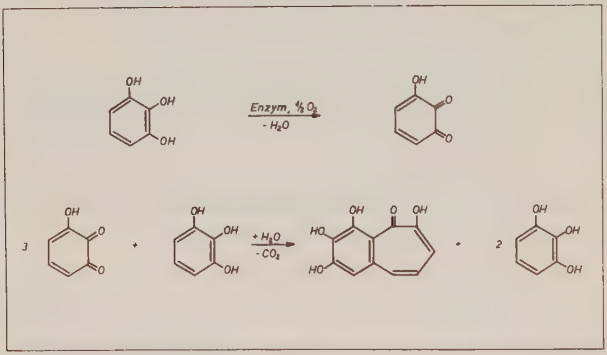


Abb. 4: Einwirkung der Phenoloxydase auf Brenzkatechin unter Zusatz steigender Mengen Thioglykolsäure
I : 0,44 mg Brenzkatechin
II : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,037 mg Thioglykolsäure
III : 0,44 mg Brenzkatechin + 0,184 mg Thioglykolsäure
IV : 0,44 mg Brenzkatechin + 1,84 mg Thioglykolsäure
V : 0,44 mg Brenzkatechin + 3,68 mg Thioglykolsäure
Reaktionsansatz: 1,75 ml Puffer pH 7,0; 0,25 ml Methanol; 0,5 ml Fermentverdünnung 1:10; 25°

Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, hat der Zusatz steigender Mengen Cystein zunächst keinen wesentlichen Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme des Systems Ferment/Brenzkatechin. Erst bei einem zehnfachen molaren Überschuß macht sich im Verlauf der Reaktion eine schwache Hemmung bemerkbar. Stärker beeinflußt wird die enzymatische Oxydation jedoch bei Vorliegen von Thiophenol, Thiosalicylsäure und Thioglykolsäure. Zehnfacher molarer Überschuß hemmt etwa um 50 % (Abb. 2,3,4). In jedem Fall ist aber mit einer deutlichen Enzymwirkung unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen zu rechnen.

Anschließend wurde festgestellt, ob eine Reaktion zwischen der Thiolkomponente und dem enzymatisch entstandenen chinoiden Oxydationsprodukt eintritt. Als Thiolkomponente wurde hierzu das Cystein herangezogen, da dieses im Cystin ein bekanntes, recht gut nachzuweisendes Oxydationspro-

dukt besitzt, und zum anderen unter den vorliegenden Bedingungen das Enzym nicht hemmt. Als phenolisches Substrat wurde Pyrogallol verwendet. Diese Verbindung bildet bei enzymatischer und nichtenzymatischer Oxydation Purpurogallin als Oxydationsprodukt, das sich photometrisch bestimmen läßt. Die Umsetzung verläuft weitestgehend quantitativ, so daß verschiedene Autoren diese Reaktion seit langem zur Bestimmung der Aktivität von Oxydationsenzymen, besonders der Peroxydase, heranziehen, ohne daß bis vor kurzem der Reaktionsablauf bekannt war (15 - 17). Der Mechanismus wurde erst von L.HORNER (18-20) aufgeklärt. Der erste Schritt besteht in der Bildung des 3-Hydroxy-o-benzochinons.



Sofern dieses Chinon als Zwischenprodukt in anderer Weise als zum Purpurogallon reagiert, muß sich das in einer Verringerung der Purpurogallinmenge bemerkbar machen. Es wurde nach dem von E. BAYER und Mitarbeitern (21) angegebenen Verfahren die gebildete Menge Purpurogallin folgender Reaktionsansätze untersucht, wobei jeweils entsprechende Mengen Enzym und Substrat eingesetzt wurden.

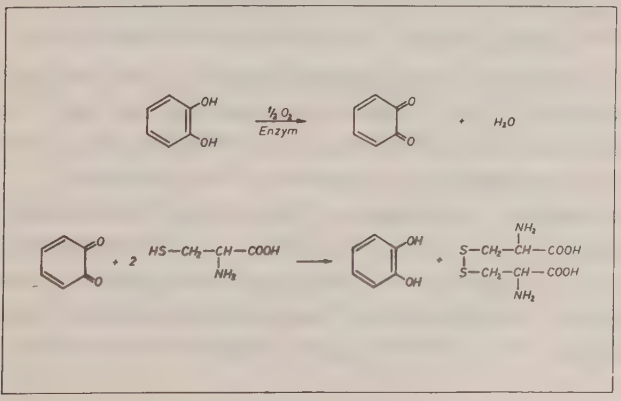
1. Phenoloxydase/Pyrogallol
2. Phenoloxydase/Pyrogallol/Cysteinhydrochlorid, wobei das molare Verhältnis Pyrogallol:Cysteinhydrochlorid=1:0,5 war
3. Wie Ansatz 2, nur mit dem molaren Verhältnis 1:2

Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Meßergebnisse zeigen, daß sowohl im Ansatz 2, wie auch im Ansatz 3 die Purpurogallinmenge (ausgedrückt als Extinktion) abgenommen hat. Die Werte sind nach 5 minütiger Reaktionszeit bestimmt. Die Abnahme im Ansatz 3 mit einem molaren Verhältnis Pyrogallol : Cysteinhydrochlorid von 1:2 ist größer als im Ansatz 2 mit dem entsprechenden molaren Verhältnis 1 : 0,5.

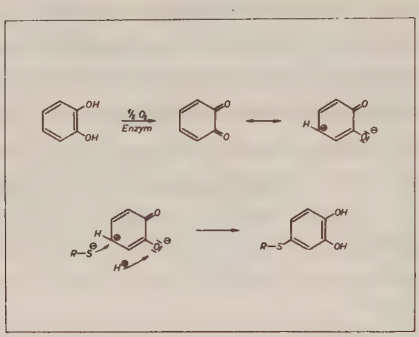
Reaktions-ansatz	E	E (Mittelwert)	E (Abnahme) x 10^3
1	0,520 0,509 0,517	0,515	
2	0,262 0,265 0,256	0,261	- 254
3	0,125 0,116 0,123	0,121	- 394

Tab. 1: Purpurogallinmenge (ausgedrückt als Extinktion)

Für den Ablauf der Reaktion Phenoloxydase/o-Diphenol/Cystein kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:
1. Die Ausbildung eines Redox-Systems



2. Addition des Cysteins an das intermediär gebildete o-Chinon



Bei Ablauf nach 1 ist manometrisch ein erhöhter Sauerstoffverbrauch zu erwarten, da das Brenzkatechin bis zur völligen Oxydation des Cysteins immer wieder anfällt und erneut oxydiert werden kann. Außerdem muß Cystin als Oxydationsprodukt nachweisbar sein.
Beim Ablauf nach 2 muß ein neues Reaktionsprodukt auftreten. Über den zu erwartenden Sauerstoffverbrauch lassen sich im voraus keine Aussagen machen. Es ist jedoch anzunehmen, daß die durch Addition gebildeten Äther auf Grund der vorliegenden o-Dihydroxygruppierung ebenfalls oxydabel sind, sofern sie ausreichend in Wasser löslich sind. H.S. MASON (13) stellte allerdings bei den von ihm untersuchten phenolischen Thioäthern keine Oxydation fest.

Aus den einleitenden Hemmversuchen war bei der Verwendung von Brenzkatechin als Substrat zu ersehen, daß nach Zusatz von Cystein kein vermehrter Sauerstoffverbrauch auftritt. Auch bei der enzymatischen Oxydation von p-Kresol, 4-Hydroxyzimtsäure, Naringenin, Kämpferol, 4,5-Dimethylbrenzkatechin, 3,4-Dihydroxyzimtsäure, Chlorogensäure, Quercetin und Pyrogallol in Gegenwart von Cystein konnte in keinem Fall ein vermehrter Sauerstoffverbrauch nachgewiesen werden. Dies spricht gegen einen Redox-Vorgang

Cystein ⟶ Cystin, wo ein vermehrter Sauerstoffverbrauch erwartet werden mußte. Um dies zu beweisen wurden 3 typische Redox-Systeme zum Vergleich herangezogen, und zwar

a) Phenoloxydase/Phenolderivat/reduziertes Triphosphorpyridinnukleotid (TPNH)
b) Phenoloxydase/Phenolderivat/Askorbinsäure
c) Phenoloxydase/Phenolderivat/Hydrochinon

Hierbei sollten sich durch Vermittlung des enzymatisch gebildeten chinoiden Oxydationsproduktes des Phenolderivats folgende Redox-Systeme ausbilden:

a) o-Chinon + TPNH ▷ Brenzkatechin + TPN
b) o-Chinon + Askorbinsäure ⟶ Brenzkatechin + Dehydroaskorbins.
c) o-Chinon + Hydrochinon ⟶ Brenzkatechin + p-Chinon

Die Phenole wurden in äquimolaren Mengen und in so geringer Konzentration eingesetzt, daß ein Sauerstoffverbrauch bei der Oxydation dieser Stoffe allein in der Warburgapparatur nicht festzustellen war. Nach Zusatz von TPNH, Askorbinsäure oder Hydrochinon zu beobachtender Sauerstoffverbrauch sollte also auf eine Oxydation dieser Stoffe hinweisen.
Von den eingesetzten Substraten zeigte 4,5-Dimethylbrenzkatechin im Warburgversuch bei der enzymatischen Oxydation bei pH 6,0 den höchsten Sauerstoffverbrauch, so daß für diese Substanz eine Konzentration festgestellt wurde, bei der kein Sauerstoffverbrauch während der Oxydation mehr zu messen war ($1{,}9 \times 10^{-5}$ M). TPNH, Askorbinsäure und Hydrochinon wurden in hundertfachem Überschuß eingesetzt, was einer Konzentration von $1{,}9 \times 10^{-3}$ M entspricht.

In den Abb. 5-7 sind die Ergebnisse dargestellt.

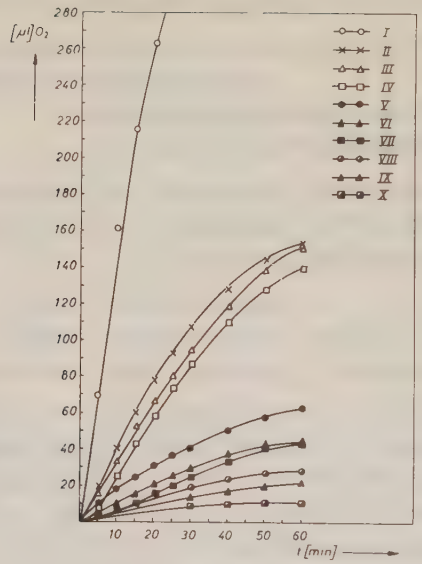


Abb. 5: Einwirkung der Phenoloxydase auf Askorbinsäure in Gegenwart von Phenolen

I : 4,5-Dimethylbrenzkatechin,
II : Quercetin,
III : Chlorogensäure,
IV : p-Kresol,
V : Naringenin,
VI : 3,4-Dihydroxyzimtsäure,
VII: 4-Hydroxyzimtsäure,
VIII: Brenzkatechin,
IX : Kämpferol,
X : Pyrogallol

Phenol-Konzentration $1{,}9 \times 10^{-5}$ M
Askorbinsäurekonzentration $1{,}9 \times 10^{-3}$ M

Reaktionsansatz: 2,0 ml Puffer pH 6,0; 25°
0,5 ml Fermentverdünnung 1:10

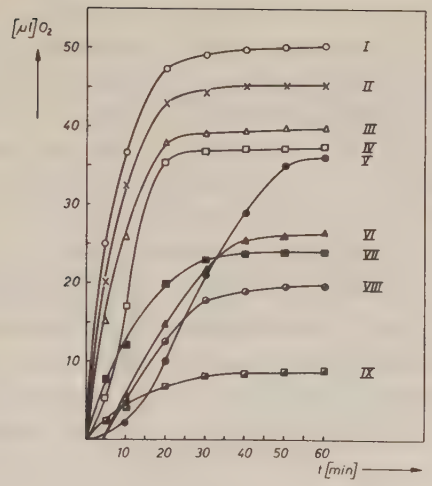


Abb. 6: Einwirkung der Phenoloxydase auf TPNH in Gegenwart von Phenolen

I : 4,5-Dimethylbrenzkatechin,
II : Quercetin,
III : Chlorogensäure,
IV : p-Kresol,
V : Naringenin,
VI : 3,4-Dihydroxyzimtsäure,
VII : Brenzkatechin,
VIII : p-Cumarsäure,
IX : Kämpferol

Phenol-Konzentration $1{,}9 \times 10^{-5}$ M
TPNH-Konzentration $1{,}9 \times 10^{-3}$ M

Reaktionsansatz: 2,0 ml Puffer pH 6,0; 25°;
0,5 ml Fermentverdünnung 1:10

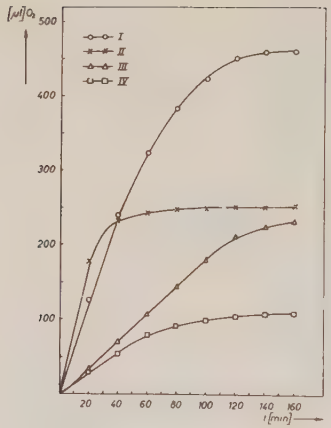


Abb. 7: Einwirkung der Phenoloxydase auf Hydrochinon in Gegenwart von Phenolen

I: Chlorogensäure, II: 4,5-Dimethylbrenzkatechin, III: 3,4-Dihydroxyzimtsäure, IV: Brenzkatechin

Phenol-Konzentration $1{,}9 \times 10^{-5}$ M
Hydrochinon-Konzentration $1{,}9 \times 10^{-3}$ M
Reaktionsansatz: 2,0 ml Puffer pH 6,0; 25°;
0,5 ml Fermentverdünnung 1:10

Es zeigt sich, daß Askorbinsäure in Gegenwart aller und TPNH in Gegenwart von neun der eingesetzten "Überträgersubstanzen" oxydiert wird. Hydrochinon hingegen ist unter den vorliegenden Bedingungen einer Oxydation nur dann zugänglich, wenn o-Diphenole die Rolle eines "Überträgers" übernehmen. Diese Ergebnisse stimmen mit ähnlichen Untersuchungen von D. KERTESZ (14) überein.
Der Ersatz der Kartoffeloxydase durch Champignonoxydase, und die Durchführung der Warburgversuche bei pH 7,0 zeigten keine prinzipiellen Unterschiede im Sauerstoffverbrauch.

Die Untersuchungen über eine Cystinbildung in dem Reaktionsansatz Phenoloxydase/4,5-Dimethylbrenzkatechin/Cystein wurden dünnschichtchromatographisch durchgeführt. Als Fließmittel diente Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1). Es konnten 3 Flecke durch Besprühen mit Ninhydrinlösung sichtbar gemacht werden, wobei es sich um ein Reaktionsprodukt Rf 0,65, nicht umgesetztes Cystein Rf 0,32 und Cystin Rf 0,06 handelt. Der Cystinfleck war sehr schwach; er ließ sich in entsprechender Stärke auch in Vergleichsansätzen nachweisen, die entweder kein Ferment oder kein 4,5-Dimethylbrenzkatechin enthielten. Die Cystinbildung sollte daher auf einer autoxydativen Zersetzung des Cysteins beruhen.

Das Auftreten eines Reaktionsproduktes, das nicht mit Cystin identisch ist und das Ausbleiben eines vermehrten Sauerstoffverbrauches deuten darauf hin, das bei dieser Reaktion kein Redox-Vorgang stattgefunden hat.

II. Addition von Thiolverbindungen an enzymatisch oxydierte Brenzkatechinderivate

In den folgenden Untersuchungen sollte versucht werden, die zu erwartenden Additionsverbindungen zu isolieren. Fraglich war, ob die Reaktion auf der Stufe der Monoadditionsverbindungen stehen bleibt, oder ob diese Thioäther auf Grund der vorliegenden Brenzkatechinstruktur weiter oxydiert werden.
Als Thiolverbindung sollte zunächst nicht das Cystein verwendet werden, da hier auf Grund der Aminogruppe mit Nebenreaktionen gerechnet werden muß. Thiophenol, Thiosalicylsäure und Thioglykolsäure wurden als geeignete Verbindungen angesehen, vor allem, da diese von L. HORNER bei seinen Untersuchungen über die Addition an 4,5-Dimethyl-o-chinon herangezogen worden waren (5). Als phenolische Verbindungen fanden tri-, di- und monosubstituierte Brenzkatechinderivate Verwendung.

a. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin / Thiophenol

Bei der enzymatischen Oxydation von 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin in Anwesenheit von Thiophenol wird unter den auf S.45 angegebenen Reaktionsbedingungen bei Rf 0,09 der Fleck eines Reaktionsproduktes erhalten, der nach dem Ansprühen mit dem Reagenz nach Folin-Ciocalteau eine schwarze Färbung aufweist und unter dem UV dunkel-violett erscheint.
Zum Beweis, daß es sich hierbei um das 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (I) handelt, wurde diese Verbindung durch Umsetzung von 4,5,6-Trimethyl-o-chinon mit Thiophenol synthetisiert. Sie zeigte gleiches chromatographisches Verhalten. Auch die UV-Spektren der dünnschichtchromatographisch abgetrennten und mit Äthanol eluierten Reaktionsprodukte waren identisch (Abb. 8).

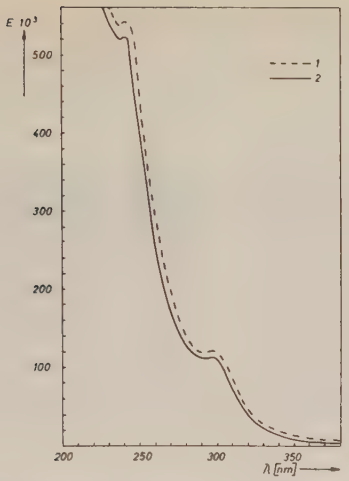
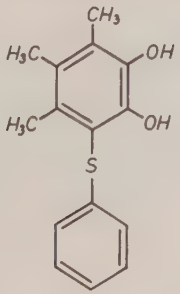


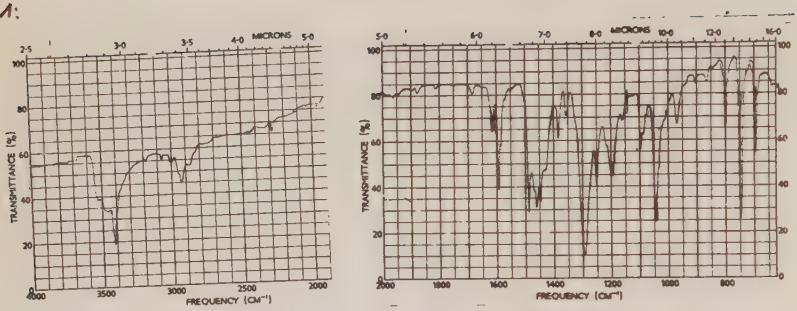
Abb. 8: UV-Spektrum von 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (I) (in Äthanol)
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Zum weiteren Identitätsbeweis wurde das Additionsprodukt aus einem größeren enzymatischen Ansatz direkt isoliert und durch Schmelzpunkt und Elementaranalyse mit dem nichtenzymatisch dargestellten Additionsprodukt verglichen. Auch die IR-Spektren beider Produkte sind identisch (Abb.9).



I

1:



2:

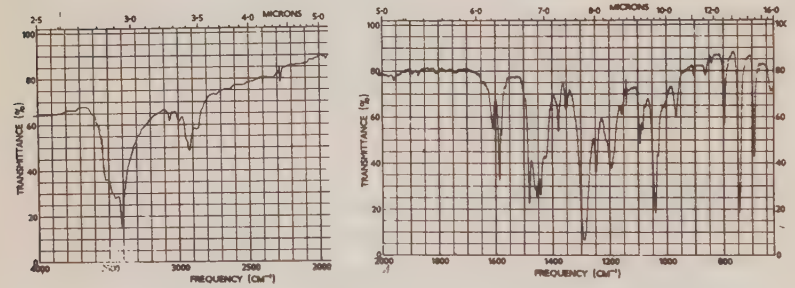


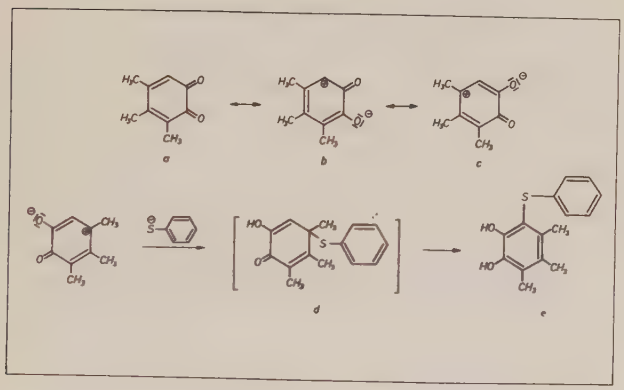
Abb. 9: IR-Spektrum von 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (I) (in KBr)

1: enzymatisch

2: nichtenzymatisch

Damit konnte erstmals aus dem Reaktionsansatz Phenoloxydase/Brenzkatechinderivat/Thiolverbindung der gebildete Thioäther isoliert werden.

Zur Erklärung der Reaktion sind die verschiedenen mesomeren Formen des o-Chinonderivates zu betrachten:



Unter der Annahme einer 1,6-Addition kann die Grenzstruktur b in Betracht gezogen werden, unter der Annahme einer 1,4-Addition die Grenzstruktur c, wobei sich das von L.HORNER bei der Umsetzung von Thiolverbindungen mit 4,5-Dimethyl-o-benzochinon geforderte unbeständige Zwischenprodukt d bildet, das sich zu e stabilisiert.

Auf Grund der vorliegenden o-Dihydroxy-Struktur war eine weitere enzymatische Oxydation von I zum entsprechenden o-Chinon zu erwarten. Da die Verbindung in Wasser weitgehend unlöslich ist, wurde sie in einem Methanol-Wasser-Gemisch gelöst. Der Methanolgehalt wurde so gering gehalten, daß noch eine ausreichende Aktivität des Enzyms gewährleistet war. (Abb. 10)

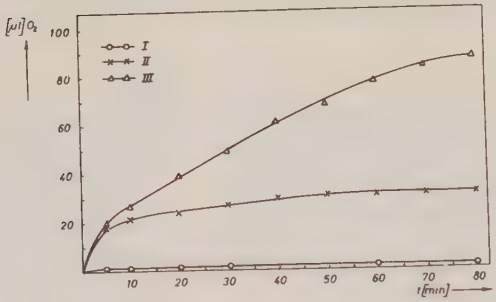
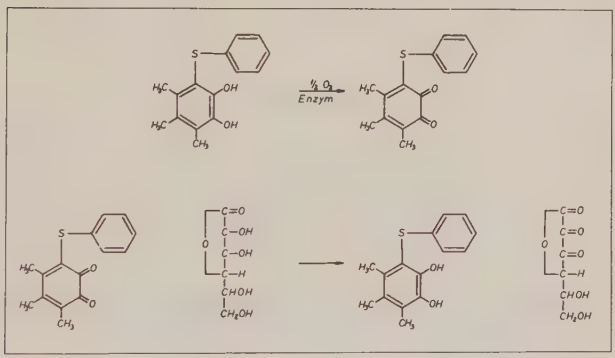


Abb. 10: Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (I)

I : 2,6 mg I in 2,0 ml Puffer pH 6,0 fein verteilt
II : 2,6 mg I in 0,25 ml Methanol gelöst;
+ 1,75 ml Puffer pH 6,0
III : Wie Ansatz II, Zusatz von 17,6 mg Askorbinsäure
Alle Ansätze enthielten 0,5 ml Fermentverdünnung 1:10; 25°

Es zeigt sich, daß die Wasserunlöslichkeit des Additionsproduktes keine enzymatische Oxydation gestattet (Ansatz I). In Lösung (Ansatz II) erfolgt Oxydation, wobei der Reaktionsansstz eine braune Farbe annimmt, die reversibel ist, was auf die Bildung eines Chinons hinweist. Dieses übt auf Askorbinsäure eine Oxydation aus, welche am erhöhten Sauerstoffverbrauch zu erkennen ist (Ansatz III).



b. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin/Thiosalicylsäure

Die enzymatische Oxydation von 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin in Gegenwart von Thiosalicylsäure ergab unter den auf Seite 45 beschriebenen Reaktionsbedingungen bei Rf 0,24 den Fleck eines Reaktionsproduktes.
Das Absorptionsspektrum war mit dem Spektrum der nichtenzymatisch erhaltenen o-(5,6-Dihydroxy-2,3,4-trimethyl-phenylthio)-benzoesäure (II) identisch (Abb. 11). Die Darstellung erfolgte aus 4,5,6-Trimethyl-o-chinon und Thiosalicylsäure.

Die Spektren wurden nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Elution mit Äthanol aufgenommen.

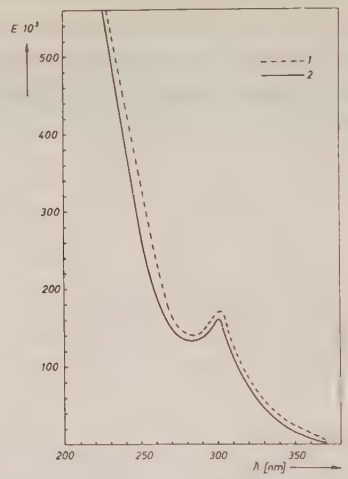
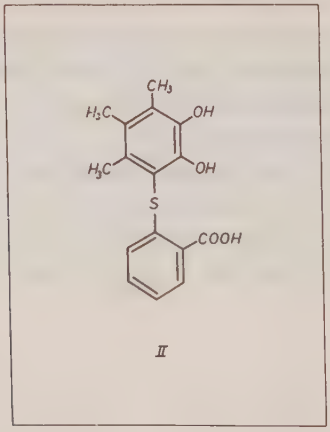


Abb. 11: UV-Spektrum von o-(5,6-Dihydroxy-2,3,4-trimethylphenylthio)-benzoesäure (II) (in Äthanol)
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Es gelang aus einem größeren enzymatischen Ansatz das Additionsprodukt zu isolieren, dessen IR-Spektrum mit



II

dem Spektrum der nichtenzymatisch erhaltenen Vergleichssubstanz übereinstimmte (Abb. 12). Die SH-Bande der Thiosalicylsäure bei 2530 cm^{-1} liegt nicht mehr vor.

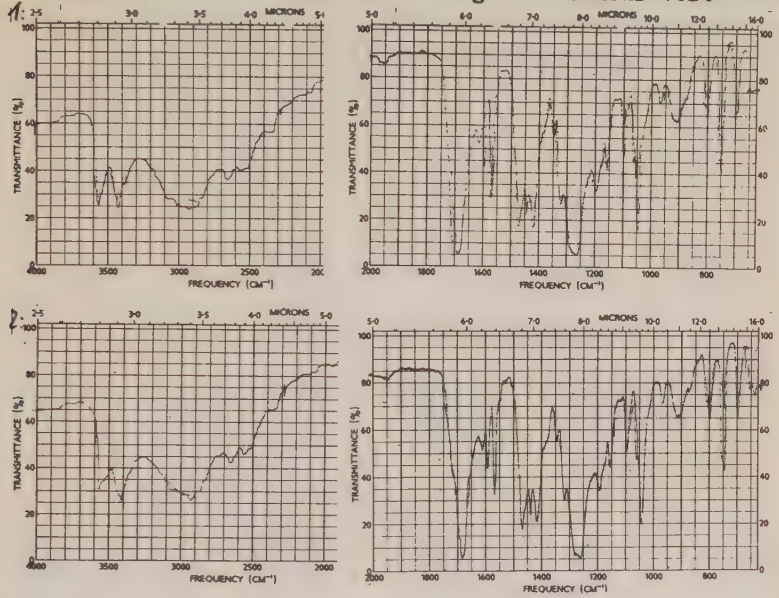


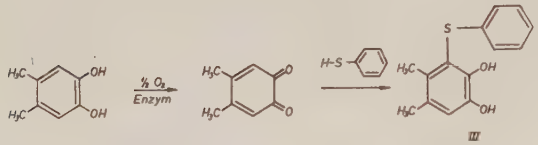
Abb. 12: IR-Spektrum von o-(5,6-Dihydroxy-2,3,4-trimethylphenylthio)-benzoesäure (II) (in KBr)
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

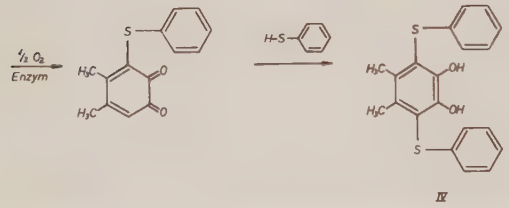
Die Verbindung ließ sich entsprechend wie I enzymatisch in 10 %iger methanolischer Lösung oxydieren.

c. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5-Dimethylbrenzkatechin Thiophenol

Beim Übergang zum 4,5-Dimethylbrenzkatechin als Substrat sind 2 nichtsubstituierte Stellen am aromatischen Ring vorhanden, die zur Addition einer Thiolverbindung zur Verfügung stehen. Es ist also zu erwarten, daß zunächst das Monoadditionprodukt [4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III)]

gebildet wird. Dieses reagiert dann bei Vorliegen eines Überschusses an Thiolverbindung nach erneuter Oxydation zum o-Chinon mit einem weiteren Molekül Thiol zu dem entsprechenden Di-Additionsprodukt | 4,5-Dimethyl-3,6-di(phenylthio)-brenzkatechin (IV) .





Wird die Thiolkomponente im Unterschuß zugegeben, so ist in erster Linie die Bildung des Monoadditionsproduktes zu erwarten. Infolge der besseren Löslichkeit des 4,5-Dimethylbrenzkatechins gegenüber III sollte die Affinität des Enzyms zum 4,5-Dimethylbrenzkatechin größer sein. Dies war auch aus sterischen Gründen zu erwarten. Dünnschichtchromatographisch war nur die Bildung eines Reaktionsproduktes Rf 0,20 zu erkennen, das auf Grund des UV-Spektrums der extrahierten Verbindung mit III, das nach einer Vorschrift von L. HORNER (5) dargestellt wurde identisch zu sein schien (Abb. 13).

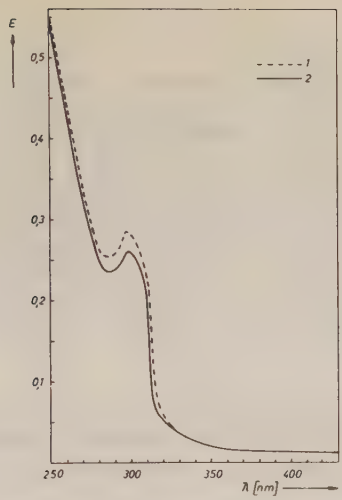
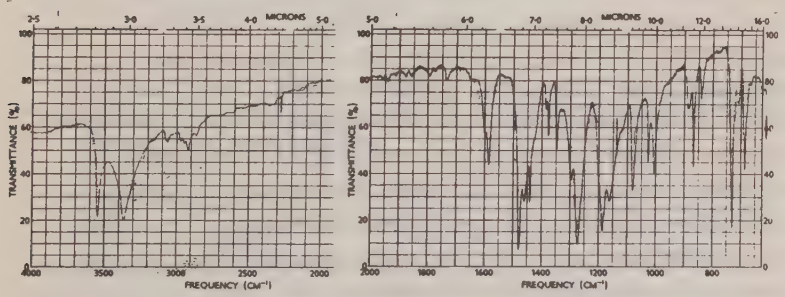


Abb. 13: UV-Spektrum von 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III) (in Äthanol)
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Diese Annahme konnte nach Isolierung des Reaktionsproduktes bestätigt werden. In Abb.14 sind die IR-Spektren dargestellt.

1:



2:

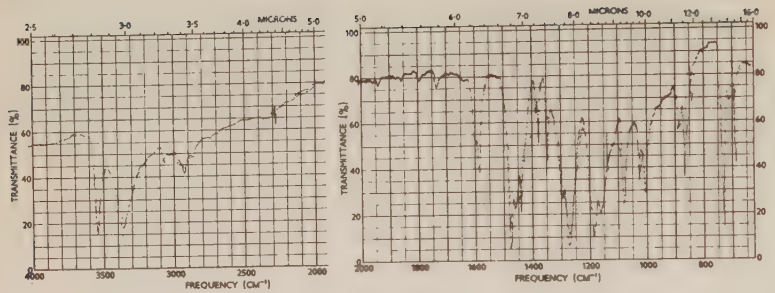


Abb. 14: IR-Spektrum von 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III) (in KBr)

1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Durch die Messung des Sauerstoffverbrauches in manometrischen Versuchen konnte festgestellt werden, daß sich die Verbindung in 10 %iger methanolischer Lösung enzymatisch oxydieren läßt, wobei das entsprechende o-Chinon entstehen sollte.

Zur enzymatischen Darstellung des Diadditionsproduktes (IV) gibt es 2 Möglichkeiten. Einmal kann das 4,5-Dimethylbrenzkatechin in Gegenwart eines zweifachen molaren Überschusses von Thiophenol oxydiert werden und zum anderen erfolgt Oxydation von III in Gegenwart von Thiophenol. Proben der Ätherausschüttelung zeigten in beiden Fällen dünnschichtchromatographisch neben dem Monoadditionsprodukt Rf 0,20 ein weiteres Reaktionsprodukt, das fast am Startpunkt liegenblieb. Es hatte den gleichen Rf-Wert wie das nichtenzymatisch dargestellte IV. Auch die UV-Spektren der beiden Verbindungen sind identisch (Abb. 15).

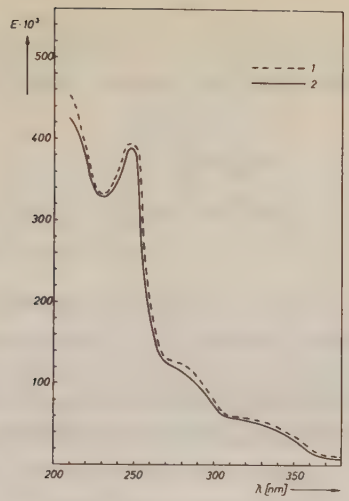
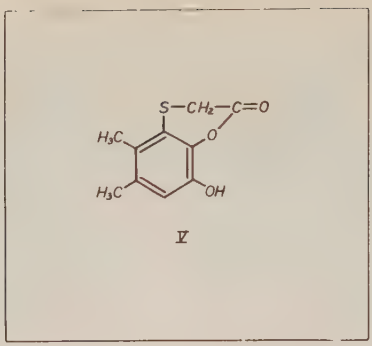


Abb. 15: UV-Spektren von 4,5-Dimethyl-3,6-di-(phenylthio)-brenzkatechin (IV) (in Äther)
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Die nichtenzymatische Darstellung des Diadditionsproduktes erfolgte durch Oxydation von III mit Tetrachlor-o-chinon zum entsprechenden o-Chinon; dieses wurde mit Thiophenol umgesetzt.
Eine Isolierung des Diadditionsproduktes aus einem enzymatischen Ansatz gelang nicht.

d. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5-Dimethylbrenzkatechin/Thioglykolsäure

Bei der enzymatischen Oxydation von 4,5-Dimethylbrenzkatechin in Gegenwart von Thioglykolsäure konnte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Fleck eines Reaktionsproduktes mit dem Rf 0,65 festgestellt werden. Zum Beweis, daß es sich hierbei um ein Additionsprodukt handelt, wurde 4,5-Dimethyl-o-chinon mit Thioglykolsäure nach einer Vorschrift von L. HORNER (5) umgesetzt. Hierbei entsteht das Lakton (V).



V

Rf-Werte und Absorptionsspektren (Abb. 16) des Reaktionsproduktes Rf 0,65 und der Vergleichssubstanz (V) stimmen überein.

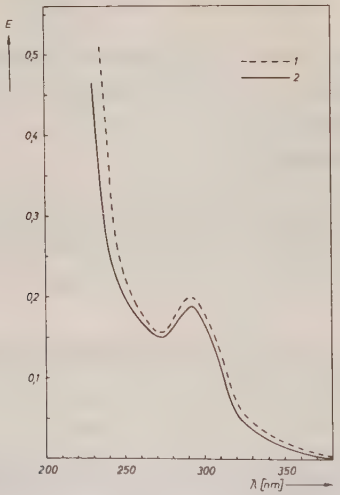


Abb. 16: UV-Spektrum des Laktons (V) (in Äthanol)

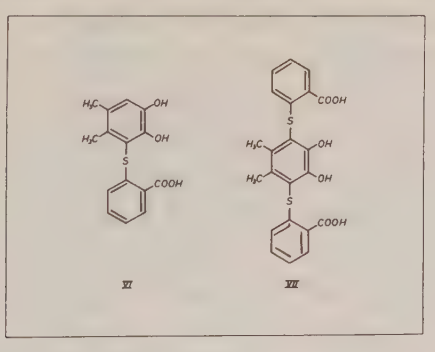
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Das Lakton konnte nicht weiter enzymatisch oxydiert werden, da es sich um eine monophenolische Verbindung handelt, die in einer o-Stellung substituiert ist. Solche Verbindungen

werden durch Phenoloxydase nicht oxydiert. Folglich war auch die Addition eines zweiten Moleküls Thioglykolsaure nicht möglich.

e. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5-Dimethylbrenzkatechin/Thiosalicylsäure

Auch bei der enzymatischen Oxydation von 4,5-Dimethylbrenzkatechin in Gegenwart von Thiosalicylsäure sind 2 Additionsprodukte zu erwarten. In Gegenwart eines Unterschusses von Thiosalicylsäure wurde dünnschichtchromatographisch ein Reaktionsprodukt nachgewiesen (Rf 0,31), dessen UV-Spektrum mit der nach L. HORNER (5) dargestellten o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI) übereinstimmte (Abb. 17).



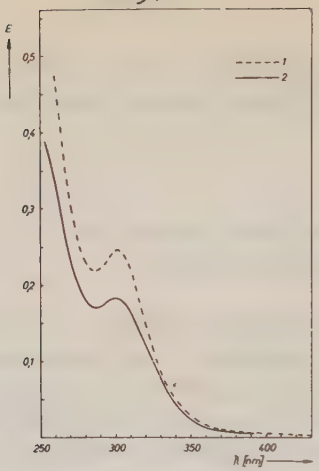


Abb. 17: UV-Spektrum der o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI) (in Äthanol)
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Die Isolierung des Reaktionsproduktes und der Vergleich der IR-Spektren bewiesen die Identität beider Verbindungen (Abb.18).

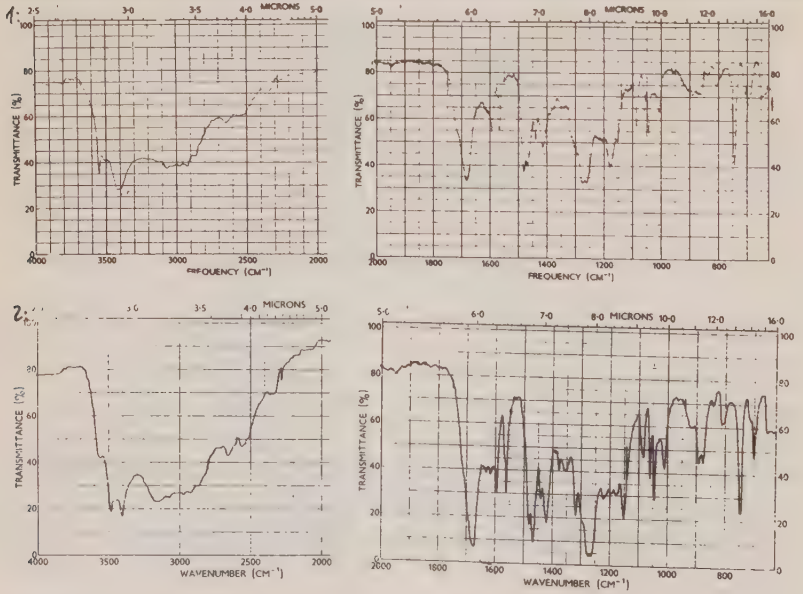


Abb. 18: IR-Spektrum der o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI) (in KBr)
1: enzymatisch 2: nichtenzymatisch

In Warburgversuchen konnte festgestellt werden, daß VI in 10 %iger methanolischer Lösung zum o-Chinon oxydiert wird, das seinerseits Askorbinsäure zur Dehydroaskorbinsäure oxydiert.

Auf entsprechende Weise, wie bei der enzymatischen Umsetzung mit Thiophenol, konnte auch mit der Thiosalicylsäure Addition zu einem Diadditionsprodukt, sowohl nach der enzymatischen Oxydation von 4,5-Dimethylbrenzkatechin mit einem Überschuß von Thiosalicylsäure, als auch nach enzymatischer Oxydation von VI in Gegenwart von Thiosalicylsäure erreicht werden. Dünnschichtchromatographisch trat neben dem Monoadditionsprodukt (Rf 0,31) ein zweites Reaktionsprodukt auf, welches fast am Startpunkt liegen blieb und dessen Rf-Wert und UV-Spektrum (Abb. 19) mit dem des 4,5-Dimethyl-3,6-di-(o-carboxy-phenylthio)-brenzkatechins (VII) übereinstimmte.

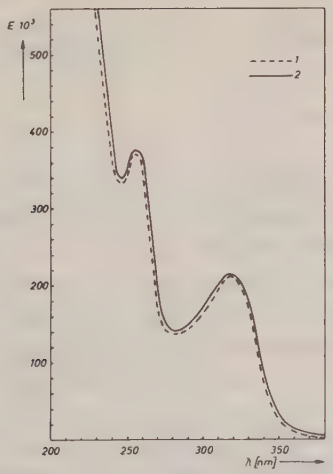
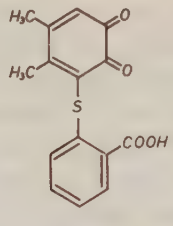


Abb. 19: UV-Spektrum von 4,5-Dimethyl-3,6-di-(o-carboxy-phenylthio)-brenzkatechin (VII) (in Äther)
1: enzymatisch
2: nichtenzymatisch

Die Darstellung des Vergleichspräparates (VII) erfolgte durch Oxydation von VI mit Tetrachlor-o-chinon zum entsprechenden Chinon (VIII).



VIII

In wässrig-äthanolischer Lösung zersetzte sich das Chinon (VIII) relativ rasch, wie die Aufnahme der Spektren der Chinonlösung in größeren Zeitabständen zeigte (Abb. 20).

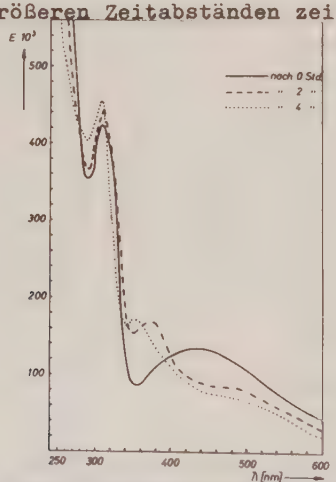
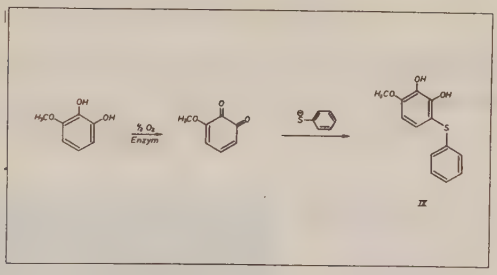


Abb. 20: Spektren des 4,5-Dimethyl-3-(o-carboxy-phenylthio)-o-benzochinons (VIII) in 10 %iger äthanolischer Lösung in Zeitabhängigkeit

Das Chinon VIII wurde mit Thiosalicylsäure zum Diadditionsprodukt umgesetzt.

f. Einwirkung der Phenoloxydase auf 3-Methoxybrenzkatechin/Thiophenol

Bei Übergang zum 3-Methoxybrenzkatechin als Substrat sind 3 nichtsubstituierte Stellen am aromatischen Ring vorhanden, die für eine Addition eines Thiols in Frage kommen. Nach L. HORNER und S. GÖWECKE (23) bildet sich als Monoadditionsprodukt bei der nichtenzymatischen Umsetzung das in 6-Stellung substituierte Derivat.



In einem enzymatischen Reaktionsansatz, der neben dem 3-Methoxybrenzkatechin die Thiolkomponente im Unterschuß enthielt, konnte dünnschichtchromatographisch ein Reaktionsprodukt Rf 0,46 nachgewiesen werden, dessen Rf-Wert und UV-Spektrum (Abb. 21) mit dem des nach L. HORNER (23) synthetisierten 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechins (IX) übereinstimmt.
Die Isolierung der Verbindung aus einem größeren enzymatischen Ansatz und der Vergleich des IR-Spektrums mit dem des 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechins bewies deren Identität (Abb. 22).

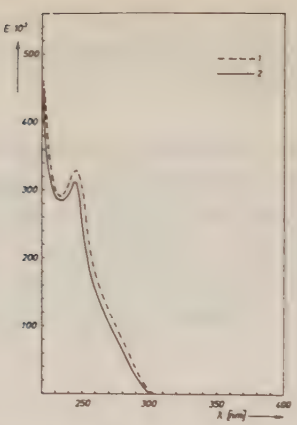


Abb. 21: UV-Spektrum von 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechin (IX) (in Äthanol)
1: enzymatisch 2: nichtenzymatisch

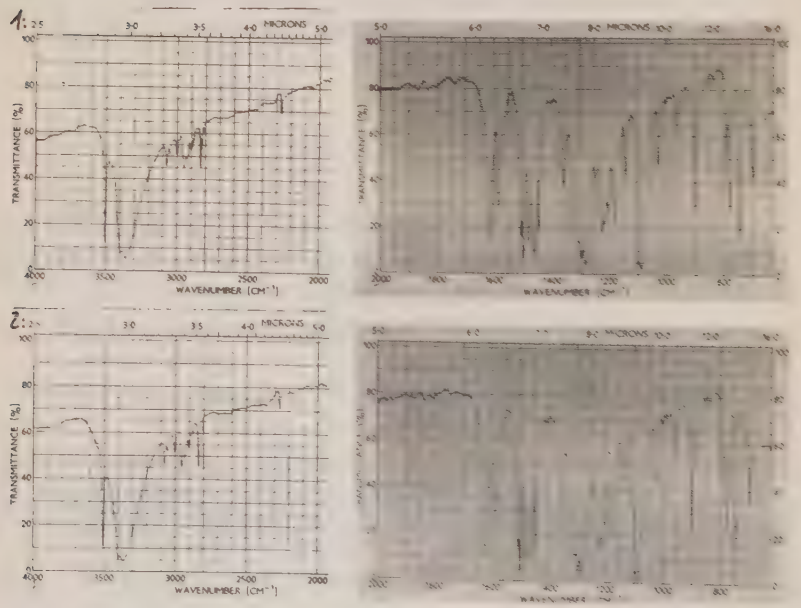


Abb. 22: IR-Spektrum von 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechin (IX) (in KBr)
1: enzymatisch 2: nichtenzymatisch

Daß auch dieses Additionsprodukt in 10 %iger methanolischer Lösung vom Enzym oxydiert wird, ließ sich in manometrischen Versuchen zeigen.

Die enzymatische Darstellung eines Diadditionsproduktes konnte wiederum auf 2 Wegen durchgeführt werden. Einmal wurde 3-Methoxybrenzkatechin in Gegenwart eines Überschusses von Thiophenol oxydiert und zum anderen erfolgte die Oxydation des Monoadditionsproduktes IX in Gegenwart einer äquimolaren Menge Thiophenol. In beiden Fällen wurde ein Reaktionsprodukt Rf 0,03 festgestellt, dessen UV-Spektrum in Abb. 23 dargestellt ist.

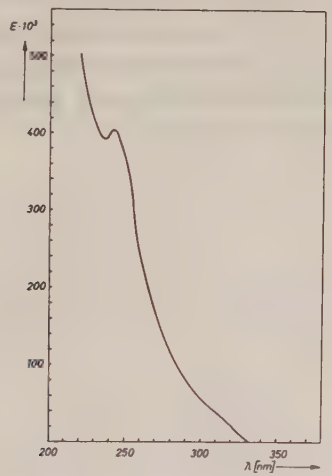


Abb. 23: UV-Spektrum des Reaktionsproduktes Rf 0,03 (in Äther)

g. Einwirkung der Phenoloxydase auf 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin/Cystein bzw. 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin/Glutathion

Zur Untersuchung, ob sich die als Modellsubstanzen herangezogenen Thiolverbindungen durch Cystein oder Glutathion

ersetzen lassen, wurde die enzymatische Oxydation von 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin in Gegenwart dieser beiden Aminosäuren dünnschichtchromatographisch verfolgt. Bei den auf Seite 47 beschriebenen Reaktionsansätzen trat unter der UV-Lampe und nach dem Besprühen mit Folin-Ciocalteau-Reagenz und Ninhydrinlösung bei Rf 0,65 (Cysteinansatz) bzw. Rf 0,61 (Glutathionansatz) der Fleck eines Reaktionsproduktes auf. Eine Isolierung der Verbindungen gelang nicht. Die Tatsache, daß sie sowohl mit Folin-Ciocalteau-Reagenz, als auch mit Ninhydrinlösung anzufärben waren, läßt auf eine Phenol- und eine Amino-Gruppe schließen. Die in Abb. 24 dargestellten Spektren der, von der Platte mit Äthanol eluierten Reaktionsprodukte wiesen Maxima bei 296 nm (Reaktionsprodukt Rf 0,61) bzw. 301 nm (Reaktionsprodukt 0,65) auf, was nicht gegen das Vorliegen eines Thioäthers spricht.

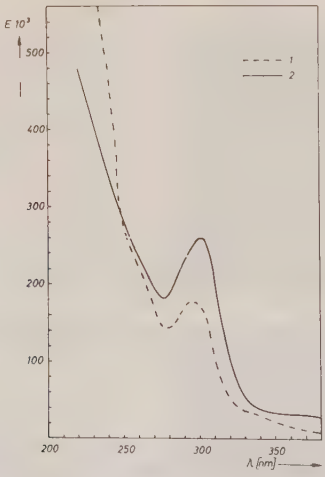
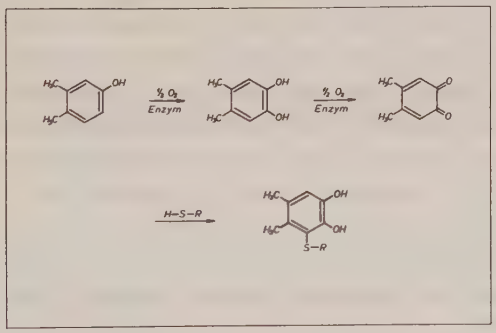


Abb. 24: UV-Spektren der Reaktionsprodukte

Rf 0,61 (Kurve 1, Glutathionansatz)
Rf 0,65 (Kurve 2, Cysteinansatz)
(in Äthanol)

III. Addition von Thiolverbindungen an o-Chinone, die durch enzymatische Oxydation von Monophenolen entstanden sind

Da die Phenoloxydase neben ihrer Eigenschaft, o-Diphenole zu o-Chinonen zu oxydieren, auch Monophenole durch o-Hydroxylierung und anschließende Oxydation zu o-Chinonen umsetzen kann, müßte sich theoretisch durch enzymatische Oxydation von 3,4-Dimethylphenol in Gegenwart von Thiolen ein Additionsprodukt nachweisen lassen. Dies sollte am Beispiel der Umsetzung
Phenoloxydase/3,4-Dimethylphenol/Thiophenol und
Phenoloxydase/3,4-Dimethylphenol/Thiosalicylsäure
untersucht werden.
Die Reaktion sollte folgenden Verlauf nehmen:



Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Ätherextrakte zeigte jeweils ein Reaktionsprodukt mit dem Rf 0,20 und 0,24. Die UV-Spektren der eluierten Verbindungen deuten darauf hin, daß es sich um 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III) bzw. o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI) handelt. Es besteht also die Möglichkeit, daß auch durch enzymatische Oxydation von Monophenolen in Gegenwart von Thiolverbindungen Thioäther gebildet werden.

C. Experimenteller Teil

I. Beschreibung der Versuche

a. Darstellung der Kartoffel-Phenoloxydase

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Phenoloxydase diente die Kartoffelsorte "Ackersegen". Die Aufbereitung erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von F. KUBOWITZ (22) durch Azeton- und Ammoniumsulfatfällungen mit anschließender Dialyse. Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurden alle Arbeiten im Kälteraum bei ca. 2° und unter Vermeidung jeglichen Kontaktes der fermenthaltigen Extrakte mit Metallgegenständen durchgeführt. Das Zentrifugieren geschah jeweils bei 0°. Der besseren Haltbarkeit wegen erfolgte eine Lyophilisation [+] der wässrigen Fermentlösung. Auf diesem Wege wurden aus 20 kg Kartoffeln 2,80 g Trockenferment erhalten.
Als Fermentstammlösung diente eine Lösung von 60,0 mg Trockenferment in 10,0 ml bidestilliertem Wasser. Die Ermittlung der Aktivität erfolgte in der Warburgapparatur (23) nach einer Methode von M. GRAUBARD und J.M. NELSON (24) mit p-Kresol als Substrat. 1 mg Trockenferment entsprach 8,5 Cresolase-Einheiten. Eine Cresolase-Einheit ist definiert als die Aktivität einer Fermentmenge, die bei pH 6,0 und 25° bei der Einwirkung auf 9,0 mg p-Kresol in 5,0 ml Lösung eine Sauerstoffaufnahme von 10 « l pro Minute, während der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit hervorruft (24).

b. Champignon-Phenoloxydase

Einige Untersuchungen wurden mit einer käuflich erworbenen Fermentpräparation aus Champignons [++] durchgeführt. Die

[+] Die Gefriertrocknung übernahm dankenswerterweise die Fa.Schering A.G. Berlin

[++] Tyrosinase from Mushrooms, Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri (USA)

verwendete Stammlösung enthielt 90 mg Trockenferment in 10,0 ml bidestilliertem Wasser. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie bei der Kartoffel-Phenoloxydase angegeben. 1 mg Trockenferment hatte eine Aktivität von 6,8 Cresolase-Einheiten.

c. Manometrische Messungen

Die manometrischen Messungen wurden in der Warburg-Apparatur (23) bei 25° durchgeführt. Als Puffer für alle Reaktionsansätze diente Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 6,0 oder 7,0 nach Mc. ILVAINE (25). Die Fermentlösung befand sich in den seitlich an den Reaktionsgefäßen angebrachten Birnen und wurde nach einem viertelstündigem Temperaturausgleich zur Reaktionslösung gegeben. Alle Meßergebnisse wurden durch Kontrollansätze, die mit Ausnahme des Ferments alle Stoffe des Versuchsansatzes enthielten korrigiert.

Für die Untersuchungen mit Pyrogallol als Substrat wurden Warburggefäße verwendet, die einen kleinen Einsatz im Hauptraum besaßen, der mit einem Streifen Filtrierpapier beschickt war und 0,1 ml 10 %ige Natronlauge enthielt. Auf diese Weise wurde das bei der enzymatischen Oxydation entstehende Kohlendioxyd gebunden.

d. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Diese Untersuchungen wurden auf Glasplatten (20 x 20 cm) durchgeführt, auf die eine Aufschlämmung von 15,0 g Cellulosepulver (MN-300 G, Fa. Mackerey, Nagel & Co., Düren) in 85,0 g Wasser aufgetragen wurde. Nach dem Trocknen erfolgte ein 15 minütiges Erwärmen bei 100°.
Als Fließmittel fanden 15 %ige Essigsäure und Butanol/Eisessig/Wasser (4+1+1) Verwendung. Die Sichtbarmachung der Flecke erfolgte mit Folin-Ciocalteau-Reagenz (26) und Ninhydrinlösung (27).

e. Spektralphotometrische Messungen

Zu spektralphotometrischen Messungen wurde das Zeiß-Spektralphotometer Modell PMQ II verwendet. Die Messungen erfolgten in 1 cm Quarzküvetten.

f. Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mühlheim/Ruhr durchgeführt.

g. IR-Spektralphotometrie

Die Substanzen wurden in KBr gepreßt und im Perkin-Elmer-Spektralphotometer Nr. 237 aufgenommen.

h. Purpurogallinbestimmung

Zur Aufstellung einer Eichgeraden wurde eine Purpurogallinlösung mit einer Konzentration von 60 γ/ml Äther mehrmals mit Äther verdünnt und die Extinktion im Elko II (Zeiß) mit dem Filter S 42 E 52 in 5 cm Glasküvetten gegen eine Blindprobe gemessen. Die in Abb. 25 eingetragenen Werte stellen Mittelwerte aus jeweils 4 Bestimmungen dar.

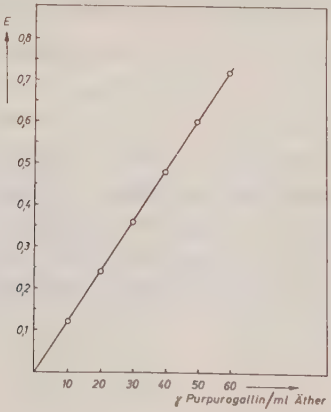


Abb. 25: Eichgerade für die Purpurogallinbestimmung

Für die Bestimmung des Purpurogallin-Gehaltes wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

1. 18,9 mg Pyrogallol in 99,5 ml Puffer pH 6,0 gelöst
   0,5 ml Fermentstammlösung
2. 18,9 mg Pyrogallol
   11,8 mg Cysteinhydrochlorid in 99,5 ml Puffer pH 6,0 gelöst
   0,5 ml Fermentstammlösung
3. 18,9 mg Pyrogallol
   47,2 mg Cysteinhydrochlorid in 99,5 ml Puffer pH 6,0 gelöst
   0,5 ml Fermentstammlösung

Sofort nach der Fermentzugabe wurden diese Ansätze in 200 ml-Jodzahlkolben bei 20° kräftig geschüttelt und nach 5 Minuten das Ferment durch Zugabe von 5 ml 4 N-Schwefelsäure inaktiviert. Das entstandene Purpurogallin wurde durch Ausschütteln mit 3 mal 30 ml Äther extrahiert und die vereinigten Ätherlösungen mit Kalziumchlorid getrocknet. Nach Filtration der auf 100 ml aufgefüllten Lösungen, wurde im Elko II die Extinktion gegen eine Blindprobe gemessen.

i. Reaktionsansätze zum dünnschichtchromatographischen und spektralphotometrischen Nachweis der Additionsprodukte

Reaktionsansätze

1. 15,2 mg 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin
   5,5 mg Thiophenol
   in 3,0 ml Methanol gelöst
   36,0 ml Puffer pH 7,0
   1,0 ml Fermentstammlösung

2. 15,2 mg 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin
   7,7 mg Thiosalicylsäure
   in 3,0 ml Methanol gelöst
   36,0 ml Puffer pH 7,0
   1,0 ml Fermentstammlösung

3. 13,8 mg 4,5-Dimethylbrenzkatechin
   5,5 mg Thiophenol
   in 3,0 ml Methanol gelöst
   36,0 ml Puffer pH 7,0
   1,0 ml Fermentstammlösung

4. 13,8 mg 4,5-Dimethylbrenzkatechin
   4,6 mg Thioglykolsäure
   39,5 ml Puffer pH 7,0
   1,0 ml Fermentstammlösung

5. 13,8 mg 4,5-Dimethylbrenzkatechin
   7,7 mg Thiosalicylsäure
   in 3,0 ml Methanol gelöst
   36,0 ml Puffer pH 7,0
   1,0 ml Fermentstammlösung

6. 14,6 mg 3-Methoxybrenzkatechin
   5,5 mg Thiophenol
   in 3,0 ml Methanol gelöst
   36,0 ml Puffer pH 7,0
   1,0 ml Fermentstammlösung

Mittels einer Aquariumpumpe wurde durch diese Reaktionsansätze in 100 ml-Erlenmeyerkolben 5 Stunden lang ein ständiger Luftstrom geleitet. Danach waren die Reaktionsansätze zwar etwas trübe, aber nicht gefärbt. Nach Inaktivierung des Enzyms mit 4 ml N-Salzsäure wurde 3 mal mit 20 ml Äther ausgeschüttelt und die organische Phase mit Kalziumchlorid getrocknet. Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden pro Startfleck 10 µl der Ätherauszüge aufgetragen. Als Fließmittel diente 15 %ige Essigsäure. Die Additionsprodukte konnten mit einer UV-Lampe (Strahlungsmaximum 254 nm) und durch Besprühen mit Folin-Ciocalteau-Lösung detektiert werden.

Für die Aufnahme der Spektren der, in den Ätherausschüttelungen vorliegenden Additionsverbindungen wurde folgendermaßen verfahren:
Auf die Startlinie der Platte wurden 0,5 ml der Ätherausschüttelung punktförmig und gleichmäßig aufgetragen und mit 15 %iger Essigsäure entwickelt. Nach Markierung der Additionsprodukte unter dem UV wurden die entsprechenden Zonen von der Platte abgeschabt und mit 10 ml Äthanol digeriert. Nach Filtration erfolgte im Spektralphotometer die Messung der Extinktion gegen eine Blindprobe.

Von den nichtenzymatisch dargestellten Vergleichssubstanzen wurden 3×10^{-3} M Lösungen hergestellt, von denen ebenfalls 0,5 ml auf die gesamte Breite der Platten aufgetragen wurden. Die weitere Behandlung erfolgte nach der oben angegebenen Methode.

Reaktionsansätze

7. 15,2 mg 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin
   15,4 mg Glutathion in 39,5 ml Puffer pH 7,0 gelöst
   0,5 ml Fermentstammlösung

8. 15,2 mg 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin
   7,9 mg Cysteinhydrochlorid in 39,5 ml Puffer pH 7,0 gelöst
   0,5 ml Fermentstammlösung

Die Versuchsbedingungen waren analog wie bei den Ansätzen 1-6, jedoch wurde schon nach einer Stunde inaktiviert und die Reaktionslösung direkt für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen verwendet. Als Fließmittel diente Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1). Die Reaktionsprodukte konnten nicht nur mit Folin-Ciocalteau-Reagenz, sondern auch mit Ninhydrinlösung sichtbar gemacht werden.

Reaktionsansätze

9. 13,8 mg 4,5-Dimethylbrenzkatechin
   22,0 mg Thiophenol
   in 10,0 ml Methanol gelöst
   80,0 ml Puffer pH 7,0
   10,0 ml Fermentstammlösung

10. 13,8 mg 4,5-Dimethylbrenzkatechin
    30,8 mg Thiosalicylsäure
    in 10,0 ml Methanol gelöst
    80,0 ml Puffer pH 7,0
    10,0 ml Fermentstammlösung

11. 24,6 mg 4,5-Dimethyl-3-phenylthio-brenzkatechin (III)
    11,0 mg Thiophenol
    in 10,0 ml Methanol gelöst
    80,0 ml Puffer pH 7,0
    10,0 ml Fermentstammlösung

12. 29,0 mg o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI)
15,4 mg Thiosalicylsäure
in 10,0 ml Methanol gelöst
80,0 ml Puffer pH 7,0
10,0 ml Fermentstammlösung

Die Lösungen 9 und 10 wurden nach 15 stündiger, die Lösungen 11 und 12 nach 5 stündiger Belüftung mit 10,0 ml N-Salzsäure inaktiviert und wie die Reaktionsansätze 1-6 behandelt. Jedoch wurde das Reaktionsprodukt jeweils mit 10 ml Äther aus der von der Platte abgeschabten Zellulosezone herausgelöst.

Reaktionsansätze

13. 12,2 mg 3,4-Dimethylphenol
5,5 mg Thiophenol
in 10,0 ml Methanol gelöst
87,0 ml Puffer pH 7,0
3,0 ml Fermentstammlösung

14. 12,2 mg 3,4-Dimethylphenol
7,7 mg Thiosalicylsäure
in 10,0 ml Methanol gelöst
87,0 ml Puffer pH 7,0
3,0 ml Fermentstammlösung

Die Behandlung dieser Ansätze unterschied sich von der für die Reaktionsansätze 1-6 nur dadurch, daß sie nach 4 stündiger Belüftung mit 10 ml N-Salzsäure inaktiviert wurden.

II. Darstellungen und Isolierungen

a. Darstellung von 4,5,6-Trimethyl-o-chinon

Die Darstellung von 4,5,6-Trimethyl-o-chinon erfolgte aus 3,4,5-Trimethylphenol durch Oxydation mittels Kaliumnitrosodisulfonat (28) nach H.J. TEUBER und G. STAIGER (29). Aus 2,04 g 3,4,5-Trimethylphenol wurden 1,92 g o-Chinon (85 % d.Th.) mit dem Schmp. 87-88° erhalten.
Lit. 88-90°(29).

b. Darstellung von 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin

In Anlehnung an eine Methode von E. DIEPOLDER (30) erfolgte die Darstellung von 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin aus dem in a) hergestellten o-Chinon mittels Reduktion durch 6 %ige wässrige Schwefeldioxydlösung.
400 mg 4,5,6-Trimethyl-o-chinon wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit derselben Menge Wasser verdünnt. Sofort danach wurde die wässrige Schwefeldioxydlösung bis zum Farbumschlag nach hellgelb hinzugefügt. Nach Abdestillieren des Benzols bei 25° wurde die zurückbleibende Lösung 3 x mit 30 ml Äther ausgeschüttelt. Der braungefärbte Ätherrückstand wurde in 100 ml Petroläther bei 60° gelöst. Nach 20 minütigem Erwärmen, wobei der verdampfte Petroläther immer wieder ergänzt wurde, wurde vom Ungelösten abfiltriert und das Filtrat langsam abgekühlt. Es fielen 210 mg (52 % d.Th.) gelb-weiß gefärbte Kristalle aus, die bei 90-91° schmolzen. Lit. 86-89° (29)

c. Darstellung von 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (I)

Zu einer Lösung von 1,50 g 4,5,6-Trimethyl-o-chinon in

200 ml Benzol wurde eine Lösung von 1,10 g Thiophenol in 20 ml Benzol gegeben. Die dunkelrote Farbe des Reaktionsgemisches schlug nach kurzem Erwärmen auf 40° nach hellgelb um. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels blieb ein gelbes Harz zurück, das beim Anreiben mit Methanol durchkristallisierte. Aus Tetrachlorkohlenstoff wurden durch einmaliges Umkristallisieren 1,7 g gelblich gefärbte Kristalle erhalten (Ausbeute 65 % d.Th.), die nach weiterer Reinigung durch Vakuumsublimation (90°) ein weißes Aussehen hatten und bei 102-103° schmolzen.

$C_{15}H_{16}O_2S$ (260,4)	Ber. C: 69,23	H: 6,16
	Gef. C: 68,86	H: 6,47

d. Darstellung von o-(5,6-Dihydroxy-2,3,4-trimethyl-phenylthio)-benzoesäure (II)

1,54 g Thiosalicylsäure wurden in 40 ml Äthanol (96 %) gelöst und mit 1,50 g 4,5,6-Trimethyl-o-chinon in kleinen Anteilen versetzt. Unter schwacher Erwärmung ging das o-Chinon rasch mit gelber Farbe in Lösung. Nach 24 stündigem Stehen wurde die ausgeschiedene Dithiosalicylsäure abfiltriert (Schmp. 285-287°) und das Filtrat auf dem Wasserbad auf 70° erwärmt. Es wurde mit der gleichen Menge heißen Wassers verdünnt. Während des Erkaltens schieden sich 2,1 g rötlich gefärbte Kristalle ab (Ausbeute 70 % d.Th.). Das aus 45 %igem Äthanol umkristallisierte fast farblose Präparat besaß einen Schmp. von 244-245°.

$C_{16}H_{16}O_4S$ (304,4)	Ber. C: 63,14	H: 5,30
	Gef. C: 62,89	H: 5,39

e. Isolierung des enzymatisch dargestellten 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechins (I)

Methode I:

600 mg 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin wurden in 100 ml Puffer pH 6,0 gelöst und mit einer Lösung von 110 mg Thiophenol in 10 ml Methanol vereinigt. Nach Zusatz von 10 ml Fermentstammlösung wurde durch die Reaktionslösung mittels einer Aquariumpumpe ein rascher Luftstrom geleitet. Eine halbe Stunde später wurde ein zweiter Reaktionsansatz von der gleichen Konzentration angesetzt und ebenso behandelt. Nach mehr als 7 Stunden zeigte sich bei dem ersten Reaktionsansatz eine schwache Gelbfärbung, woraus zu schließen war, daß das im Unterschuß zugesetzte Thiophenol umgesetzt war, und das überschüssige 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin zum gelbgefärbten o-Chinon oxydiert wurde.
Das Ferment des zweiten, ungefärbten Ansatzes wurde nach 7 Stunden durch Zugabe von 11 ml N-Salzsäure inaktiviert und die Lösung mit 3 x 40 ml Äther ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Kalziumchlorid wurde der Äther im Vakuum abgezogen. Aus dem graugefärbten Ätherrückstand wurde das, in Wasser lösliche 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin sorgfältig herausgewaschen, bis dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden konnte, daß nur noch das in Wasser kaum lösliche Additionsprodukt zurückgeblieben war. Dieses wurde 2 Mal aus wenig Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert. Die farblosen Prismen hatten einen Schmp. von 100-101°. Der Rf-Wert betrug 0,09 (15 %ige Essigsäure) und das Absorptionsspektrum stimmte mit dem, des in II c dargestellten Präparates überein.

Methode II:

Da mit der ersten Methode nur geringe Ausbeuten zu erzielen waren, wurde eine zweite Vorschrift ausgearbeitet.

600 mg 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin wurden in 100 ml Puffer pH 6,0 gelöst, mit 10 ml Fermentstammlösung versetzt und die Reaktionslösung mittels einer Aquariumpumpe belüftet. Nach 20 Minuten wurde mit 11 ml N-Salzsäure inaktiviert und dem Reaktionsgemisch eine Lösung von 2,2 g Thiophenol in 100 ml Äther aus einer Bürette hinzugefügt, bis das gesamte o-Chinon umgesetzt war. Hierzu waren 17,2 ml erforderlich. Dann wurde die Ätherschicht abgetrennt, noch zweimal mit 40 ml Äther ausgeschüttelt und der Ätherrückstand genauso behandelt, wie nach der ersten Methode. Nach dem Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff betrug die Ausbeute an farblosen Kristallen 402 mg (45 % d.Th.). Der Schmp. lag bei 100-101°.
Zur weiteren Reinigung wurde bei 90° im Vakuum sublimiert und ein weißes Kristallpulver erhalten, das bei 102-103° schmolz.

$C_{15}H_{16}O_2S$ (260,4)	Ber. C: 69,23	H: 6,16
	Gef. C: 69,70	H: 5,92

f. Isolierung der enzymatisch dargestellten o-(5,6-Dihydroxy-2,3,4-trimethyl-phenylthio)-benzoesäure (II)

Als Ausgangsmaterial dienten 600 mg 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin, die nach der in IIe angegebenen Vorschrift aufgearbeitet wurden. Nach Zugabe von 16,7 ml ätherischer Thiosalicylsäurelösung, die 3,08 g Thiosalicylsäure in 100 ml Äther enthielt, war alles o-Chinon umgesetzt. Das Rohprodukt wurde aus 45 %igem Äthanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 560 mg (55 % d.Th.) an farblosen Kristallen, die bei 244-246° schmolzen.

$C_{16}H_{16}O_4S$ (304,4)	Ber. C: 63,14	H: 5,30
	Gef. C: 62,75	H: 5,35

g. Darstellung von 4,5-Dimethyl-o-chinon

Die Darstellung von 4,5-Dimethyl-o-chinon erfolgte durch Oxydation von 1,0 g 3,4-Dimethylphenol nach H.J. TEUBER und G. STAIGER (27). Die Ausbeute betrug 870 mg rote Kristalle (79 % d.Th.), die bei 100-101° schmolzen. Lit. 103-104 (27).

h. Darstellung von 4,5-Dimethylbrenzkatechin

Zur Darstellung wurde die in IIb beschriebene Methode nach E. DIEPOLDER (28) verwendet.
Aus 400 mg 4,5-Dimethyl-o-chinon wurden 295 mg (73 % d. Th.) der reduzierten Verbindung erhalten, die in kleinen Prismen kristallisierte. Schmp. 87-88°. Lit. 87-88° (28).

i. Darstellung von 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III)

Die nichtentzymatische Darstellung von 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III) erfolgte nach L. HORNER und K. STURM (5).
Aus 0,68 g 4,5-Dimethyl-o-chinon und 0,55 g Thiophenol wurden nach dem Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff 915 mg (70 % d. Th.) gelblich gefärbte Kristalle mit einem Schmp. von 105° erhalten. Nach Sublimation im Vakuum bei 100° betrug der Schmp. 108° und die Kristalle waren weiß. Lit. 109° (5).

$C_{14}H_{14}O_2S$ (246,3)	Ber. C: 68,25	H: 5,73
	Gef. C: 68,75	H: 5,73

In konz.Schwefelsäure löst sich das Monoadditionsprodukt III erst olivgrün und färbt sich dann violett, während das Diadditionsprodukt IV eine beständige hell-blaugrüne Färbung zeigte.

k. Isolierung des enzymatisch dargestellten 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechins (III)

552 mg 4,5-Dimethylbrenzkatechin wurden in 100 ml Puffer pH 6,0 gelöst, mit 10 ml Fermentstammlösung versetzt und nach 20 Minuten mit 11 ml N-Salzsäure inaktiviert. Anschließend wurde nach der in IIe2 beschriebenen Weise verfahren, wobei der Verbrauch an ätherischer Thiophenollösung 16,6 ml betrug. Nach dem Umkristallisieren aus Tetrachlorkohlenstoff belief sich die Ausbeute an farblosen Kristallen auf 402 mg (49 % d.Th.). Zur weiteren Reinigung wurde bei 100° im Vakuum subliniert und ein weißes Kristallpulver erhalten, das bei 108° schmolz. Lit. 109° (5).

$C_{14}H_{14}O_2S$ (246,3) Ber. C: 68,25 H: 5,73
Gef. C: 68,09 H: 5,82

l. Darstellung von 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-o-benzochinon

1,24 g 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin (III) wurden in 5 ml frisch destilliertem Äther gelöst und unter Kühlen und Rühren in eine Lösung von 1,26 g Tetrachlor-o-chinon in 20 ml Äther gegeben. Danach wurde sofort auf ca. -25° abgekühlt. Es fielen 1,15 g (94 % d.Th.) 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-o-benzochinon aus; dieses wurde sofort weiterverarbeitet.

m. Darstellung von 4,5-Dimethyl-3,6-di-(phenylthio)-brenzkatechin (IV)

Die Lösung von 0,62 g 4,5-Dimethyl-3-(phenylthio)-o-benzochinon in 30 ml Benzol wurde mit einer Lösung von 0,28 g Thiophenol in 7 ml Benzol vereinigt und wie unter IIc angegeben weiterbehandelt. Jedoch war ein 30 minütiges Erwärmen notwendig, um den Farbumschlag der Reaktionslösung herbeizuführen. Nach Abziehen des Benzols blieb ein langsam

durchkristallisierendes Harz zurück (0,65 g). Aus wenig Tetrachlorkohlenstoff wurde umkristallisiert und 0,48 g (53 % d. Th.) kleine weiße Nadeln erhalten, die bei 126-127° schmolzen.

$C_{20}H_{18}O_2S_2$ (354,5) Ber. C: 67,77 H: 5,12
Gef. C: 67,82 H: 5,09

n. Darstellung des Laktons V aus 4,5-Dimethyl-o-benzochinon und Thioglykolsäure

Die Verbindung wurde in Anlehnung an L. HORNER und K. STURM (5) gewonnen.
1 ml 80 %ige Thioglykolsäurelösung wurde innerhalb einer Minute mit 1,50 g 4,5-Dimethyl-o-benzochinon versetzt. Das o-Chinon löste sich unter Erwärmung, wobei sich ein goldgelber Sirup bildete. Dieser wurde in 150 ml Äther gelöst und je 2 x mit 30 ml gesättigter Bicarbonatlösung und 2 x mit 5 ml Wasser gewaschen. Diese Operation wurde 5 x wiederholt. Nach Abdestillieren des Äthers wurde das gelbe Harz in 20 ml Benzol aufgenommen und auf eine 10 cm lange Säule, deren Durchmesser 1,6 cm betrug und die mit neutralem Aluminiumoxyd Woelm, Aktivitätsstufe IV gefüllt war, gegeben. Mit 180 ml Benzol wurde eluiert. Der gelbe und harzige Benzolrückstand wurde aus 8 ml Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert und 95 mg schwach gelblich gefärbte Kristalle erhalten, die zwischen 134-145° schmolzen. Nach 5maligem Umkristallisieren aus wenig Tetrachlorkohlenstoff wurden 1,2 mg farblose Nädelchen erhalten, die bei 152° schmolzen. Lit. 154-155° (5).

o. Darstellung von o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI)

Nach einer Vorschrift von L. HORNER und K. STURM (5) wurden 0,8 g Thiosalicylsäure und 0,68 g 4,5-Dimethyl-o-benzochinon

vereinigt. Die Ausbeute betrug 1,09 g (75 % d.Th.) rötlich gefärbte Kristalle, die im Vakuum bei 155° sublimiert wurden. Das Endprodukt stellte ein weißes Kristallpulver dar, welches bei 236-237° schmolz. Lit. 238-240° (5).

$C_{15}H_{14}O_4S$ (290,3)	Ber. C: 62,06	H: 4,86
	Gef. C: 61,75	H: 4,89

p. Isolierung der enzymatisch dargestellten o-(5,6-Dihydroxy-2,3-dimethyl-phenylthio)-benzoesäure (VI)

552 mg 4,5-Dimethylbrenzkatechin wurden in 100 ml Puffer pH 6,0 gelöst und mit 10 ml Fermentstammlösung oxydiert. Nach 20 Minuten wurde mit 11 ml N-Salzsäure inaktiviert. In schneller Folge wurde mit einer Lösung, die 3,08 g Thiosalicylsäure in 100 ml Äther enthielt, tropfenweise versetzt und nach Zugabe von 17,5 ml die Entfärbung der Reaktionslösung erreicht. Anschließend wurde nach der in IIel beschriebenen Methode weiterverfahren.
Die Ausbeute betrug nach dem Trocknen 586 mg (57 % d.Th.) eines schmutzig-weißen Pulvers, das bei 155° im Vakuum sublimiert wurde. Der Schmp. lag bei 237-238°.
Lit. 238-240° (5).

$C_{15}H_{14}O_4S$ (290,3)	Ber. C: 62,06	H: 4,86
	Gef. C: 61,82	H: 4,82

q. Darstellung von 4,5-Dimethyl-3-(o-carboxy-phenylthio)-o-benzochinon (VIII)

Die Lösungen von 1,45 g VI in 60 ml frisch destilliertem Äther und 1,25 g Tetrachlor-o-chinon in 15 ml Äther wurden unter Kühlen und Rühren vereinigt. Durch Zugabe von insgesamt 45 ml Petroläther gelang bei einer Temperatur von ca. -25° die Fällung des o-Chinons. Die Ausbeute betrug 1,37 g (95 % d.Th.). Das o-Chinon wurde sofort weiterverarbeitet.

r. Darstellung von 4,5-Dimethyl-3,6-di-(o-carboxy-phenylthio)-brenzkatechin (VII)

0,77 g Thiosalicylsäure wurden in 20 ml 96 %igem Äthanol gelöst und 1,4 g 4,5-Dimethyl-3-(o-carboxy-phenylthio)-o-benzochinon in kleinen Anteilen hinzugefügt, worauf sich ein weißer Niederschlag bildete. Die Ausbeute betrug 1,5 g. Zur Kristallisation wurden 0,5 g des Präparates in 250 ml absolutem Alkohol zur Lösung gebracht und das heiße Filtrat mit 280 ml heißem Wasser verdünnt. Über Nacht schieden sich 0,39 g Kristalle ab (57 % d.Th.), die bei 286-288° schmolzen.

$C_{22}H_{18}O_6S_2$ (442,5)	Ber. C: 59,72	H: 4,10
	Gef. C: 59,33	H: 4,23

s. Darstellung von 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechin (IX)

Die Darstellung dieses Additionsproduktes, das als Vergleichssubstanz benötigt wurde, erfolgte nach einer Vorschrift von L. HORNER und S. GÖWECKE (23).
Aus 7,0 g 3-Methoxy-o-benzochinon und 6,2 g Thiophenol wurden 8,9 g (71 % d.Th.) gelblich gefärbte Kristalle erhalten, die nach Sublimation im Vakuum bei 95° einen Schmp. von 96-97° hatten. Lit. 95,5-96,5° (23).

$C_{13}H_{12}O_3S$ (248,3)	Ber. C: 62,88	H: 4,87
	Gef. C: 62,68	H: 5,00

t. Isolierung des enzymatisch dargestellten 3-Methoxy-6-(phenylthio)-brenzkatechins (IX)

584 mg 3-Methoxybrenzkatechin wurden in 100 ml Puffer pH 6,0 gelöst und mit 10 ml Fermentstammlösung oxydiert. Nach

20 Minuten, in denen der Reaktionsansatz gut belüftet wurde, inaktivierte ein Zusatz von 11 ml N-Salzsäure das Ferment. Anschließend wurden 17,2 ml einer ätherischen Thiophenollösung, die 2,2 g Thiophenol in 100 ml Äther enthielt, hinzugefügt und entsprechend IIe2 aufgearbeitet. Das schmutzig-graue Rohprodukt wurde aus Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert und 431 mg (51 % d.Th.) farblose Kristalle erhalten, die bei 95° im Vakuum sublimiert wurden. Der Schmp. betrug 94-95°. Lit. 95,5-96,5 (23).

$C_{13}H_{12}O_3S$ (248,3)	Ber. C: 62,88	H: 4,87
	Gef. C: 62,56	H: 5,03

D. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die enzymatische Oxydation einiger Brenzkatechinderivate in Gegenwart von Thiolverbindungen untersucht. Diese Frage schien im Hinblick auf das Verhalten natürlich vorkommender Thiolverbindungen, wie Cystein und Glutathion, von Interesse. Bisher war es nicht gelungen, Reaktionsprodukte bei derartigen Reaktionen zu isolieren. Als Modellsubstanzen wurden Thiophenol, Thiosalicylsäure und Thioglykolsäure herangezogen, deren Verhalten bei der enzymatischen Oxydation des 4,5,6-Trimethylbrenzkatechins, des 4,5-Dimethylbrenzkatechins und des 3-Methoxybrenzkatechins durch das Oxydationsenzym Phenoloxydase untersucht wurde.
Orientierende Untersuchungen ergaben, daß bei diesen Reaktionen Disulfidbildung, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Es findet in allen Fällen Addition zu Thioäthern statt. Enzymatische Umsetzung von 4,5,6-Trimethylbrenzkatechin in Gegenwart von Thiophenol bzw. Thiosalicylsäure ergab den entsprechenden Thioäther. Diese Verbindung, das 4,5,6-Trimethyl-3-(phenylthio)-brenzkatechin, ließ sich enzymatisch weiter zum o-Chinon oxydieren, was jedoch wegen der ungenügenden Wasserlöslichkeit des Thioäthers den Zusatz von 10 % Methanol erforderte.

Enzymatische Oxydation des 4,5-Dimethylbrenzkatechins in Gegenwart von Thiophenol oder Thiosalicylsäure ergab zunächst die Bildung eines Monoadditionsproduktes, das in verdünnter methanolischer Lösung ebenfalls weiter oxydierbar war. Hierbei konnte die Addition eines zweiten Moleküls Thiolverbindung nachgewiesen werden.
Oxydation in Anwesenheit der Thioglykolsäure ergab nach der Addition eines Moleküls Laktonbildung. Das hatte zur Folge, daß eine weitere enzymatische Oxydation wegen des Fehlens der strukturellen Voraussetzungen nicht mehr

möglich war.
Auch die Oxydation des 3-Methoxybrenzkatechins in Gegenwart von Thiophenol ergab die Bildung von Thiolverbindungen. Hierbei konnte ein Monoadditionsprodukt isoliert werden, während ein zweites Reaktionsprodukt, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Diadditionsprodukt handelt, nachgewiesen werden konnte. Die letztere Verbindung konnte jedoch nicht isoliert werden.
Monophenole lassen sich nach enzymatischer Hydroxylierung durch die Phenoloxydase zum Brenzkatechinderivat ebenfalls mit Thiolverbindungen in Thioäther überführen.
Am Beispiel des 4,5,6-Trimethylbrenzkatechins wurde nachgewiesen, daß auch Glutathion und Cystein nach enzymatischer Oxydation des Brenzkatechinderivates zu Thioäthern umgesetzt werden.

E. Literaturverzeichnis

1. J. Troeger u. A. Eggert, J. prakt. Chem. 53, 478 (1896)
2. T. Posner, Liebigs Ann. Chem. 336, 85 (1904)
3. O. Dimroth, L. Kraft, K. Aichinger, Liebigs Ann. Chem. 545, 124, (1940)
4. M. Schubert, J. Amer. chem. Soc. 69, 712 (1947)
5. L. Horner u. K. Sturm, Liebigs Ann. Chem. 597, 1 (1955)
6. H.W. Wanzlick, Angew. Chem. 72, 581 (1960)
7. R.F. Porter, W.W. Rees, E. Frauenglass, H.S. Wilgus,III, G.H. Nawn, P.P. Chiesa, J.W. Gates jr., J. org. Chemistry 29, 588 (1964)
8. S. Bouchilloux u. A. Kodja, C.R. hebd. Séances Acad.Sci. 251, 1920 (1960)
9. R.E. Billingham u. W.K. Silvers, Quart. Rev. Biol. Vol. 35, 1 (1960)
10. S. Roston, Nature London 203, 1075 (1965)
11. S. Roston, J. biol. Chemistry 235, 3315 (1960)
12. E.A.H. Roberts, Chem. and Ind. 995, (1959)
13. H.S. Mason, Nature London 175, 771 (1955)
14. D. Kertesz u. O. Azzopardi, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 945 (1960)
15. R. Willstätter u. A. Stoll, Liebigs Ann. Chem. 416, 21 (1918)
16. R. Willstätter u. A. Pollinger, Liebigs Ann. Chem. 430, 269 (1923)
17. D. Keilin u. T. Mann, Proc. Roy. Soc. London , Ser. B 125, 187 (1938)
18. L. Horner u. W. Dürckheimer, Z. Naturforsch. 14b, 744 (1959)
19. L. Horner, K.H. Weber u. W. Dürckheimer, Chem. Ber. 94, 2881 (1961)
20. L. Horner u. S. Göwecke, Chem. Ber. 94, 1267 (1961)
21. E. Bayer, F. Born u. K.H. Reuther, Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. 105, 77 (1957)
22. F. Kubowitz, Biochem. Z. 292, 221 (1937); 299, 32 (1938)

23. F. Dickens in E. Bamann u. K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, S. 987
24. M. Graubard u. J.M. Nelson, J. biol. Chemistry 111, 757 (1935)
25. M. Steiner in E. Bamann u. K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, S. 786
26. E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, S. 512
27. E. Stahl, Ibid S. 509
28. D.J. Cram u. R.A. Reeves, J. Amer. chem. Soc. 80, 3094 (1958)
29. H.J. Teuber u. G. Staiger, Chem. Ber. 88, 802 (1955)
30. E. Diepolder, Ber.dtsch.chem. Ges. 44, 2498 (1911)

Lebenslauf

Ich wurde am 28. April 1934 als Sohn des Apothekers Hans Jürgen Freiherr von Lehmann und seiner Ehefrau Margot, geb. Plack, in Berlin-Zehlendorf geboren. Im März 1953 bestand ich dort an der Schadowschule die Reifeprüfung.

Meine zweijährige Ausbildung als Apothekerpraktikant erhielt ich in der Adler Apotheke in Berlin-Zehlendorf. Nach bestandenem Vorexamen begann ich im Sommersemester 1955 das Pharmaziestudium an der Universität Würzburg. Nach drei Semestern führte ich mein Studium an der Freien Universität Berlin zu Ende. Ich legte dort im Mai 1958 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Nach einjähriger Kandidatenzeit war ich bis Ende 1959 als approbierter Apotheker in der Adler Apotheke in Berlin-Zehlendorf tätig. Im Januar 1960 begann ich mit meiner Doktorarbeit, die ich von März 1961 bis Juni 1962 wegen der Übernahme einer Apotheke unterbrach.